

COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (CGH)

Publication number: JP7505053T

Publication date: 1995-06-08

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: C12N15/09; C07H21/04; C12Q1/68; C12N15/09;
C07H21/00; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68;
C07H21/04; C12N15/09

- european: C12Q1/68A6; C12Q1/68B14; C12Q1/68D2E;
C12Q1/68M6B

Application number: JP19930515791T 19930301

Priority number(s): WO1993US01775 19930301; US19920846659
19920304; US19920969948 19921030

Also published as:

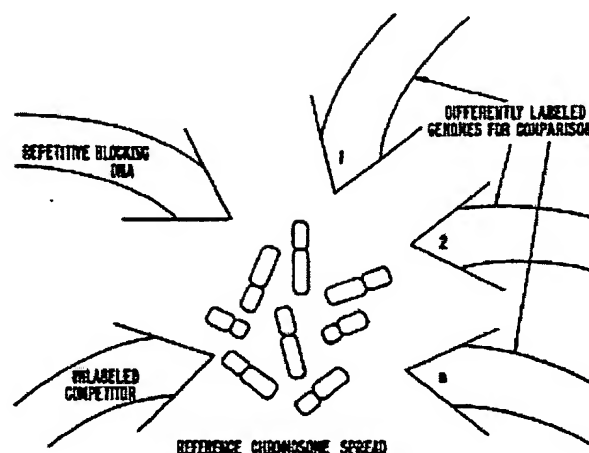
WO9318186 (A1)
EP0631635 (A1)
EP0631635 (A0)
EP0631635 (B1)
CA2131543 (C)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP7505053T

Abstract of corresponding document: **WO9318186**

Disclosed are new methods comprising the use of in situ hybridization to detect abnormal nucleic acid sequence copy numbers in one or more genomes wherein repetitive sequences that bind to multiple loci in a reference chromosome spread are either substantially removed and/or their hybridization signals suppressed. The invention termed Comparative Genomic Hybridization (CGH) provides for methods of determining the relative number of copies of nucleic acid sequences in one or more subject genomes or portions thereof (for example, a tumor cell) as a function of the location of those sequences in a reference genome (for example, a normal human genome). The intensity(ies) of the signals from each labeled subject nucleic acid and/or the differences in the ratios between different signals from the labeled subject nucleic acid sequences are compared to determine the relative copy numbers of the nucleic acid sequences in the one or more subject genomes as a function of position along the reference chromosome spread. Amplifications, duplications and/or deletions in the subject genome(s) can be detected. Also provided is a method of determining the absolute copy numbers of substantially all RNA or DNA sequences in subject cell(s) or cell population(s).



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-505053

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)6月8日

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

序内整理番号

F I

C 1 2 Q 1/68

A 9453-4B

C 0 7 H 21/04

B 8615-4C

C 1 2 N 15/09

9281-4B

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願平5-515791
(86) (22) 出願日 平成5年(1993)3月1日
(85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)9月6日
(86) 国際出願番号 PCT/US93/01775
(87) 国際公開番号 WO93/18186
(87) 国際公開日 平成5年(1993)9月16日
(31) 優先権主張番号 846, 659
(32) 優先日 1992年3月4日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 969, 948
(32) 優先日 1992年10月30日
(33) 優先権主張国 米国 (US)

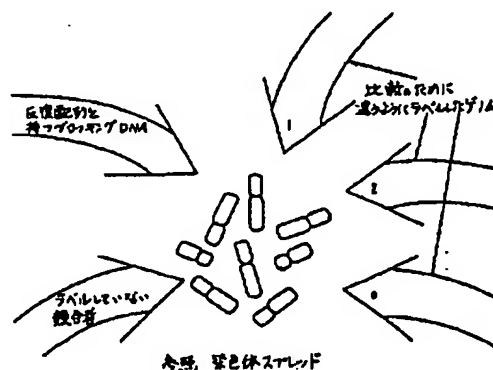
(71) 出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94612-3555 オークランド トゥエンテ
ィセカンドフロア レイクサイドドライブ
300
(72) 発明者 ビンケル ダニエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94595 ウォルナットクリーク マンザニ
タコート 31
(74) 代理人 弁理士 長谷 照一 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH)

(57) 【要約】

ここに開示するのは、参照染色体スプレッドの複数の座位に結合する反復配列が実質的に除かれるか、またはそれらのハイブリダイゼーションシグナルが抑えられている一つまたはそれ以上のゲノムにおいて、異常な核酸配列のコピー数を検出するための、in situ ハイブリダイゼーションを利用した新しい方法である。比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) と呼ばれるその発明は、一つまたはそれ以上の対象となるゲノムやその一部 (たとえば腫瘍細胞) において核酸配列の相対的コピー数を、参照ゲノム (たとえば正常ヒトゲノム) におけるそれらの核酸配列の位置の関数として決定する方法をもたらす。一つまたはそれ以上の対象ゲノムの核酸配列の相対コピー数を決定するために、各々ラベルされた対象核酸からのシグナルの強度や、ラベルされた対象核酸配列からの異なるシグナル強度間の比の差が、参照染色体スプレッドの位置の関数として比較される。対象ゲノムにおける増幅、重複や欠損が、検出される。ここに提供された方法は、対象となる細胞や細胞集団における実質的に全てのRNAやDNA配列の絶対コピー数



を決定する方法でもある。

1. 次の(a)~(g)の工程、即ち、

- a) 対象細胞、あるいはいくつかの対象細胞集団からDNAを抽出する工程、
- b) 前記抽出された対象DNAをもし必要であれば増幅する工程、
- c) 前記対象DNAをラベルする工程、
- d) 参照となる中期染色体中の単一コピー配列に結合するラベルした対象DNA中の配列が十分にあり、またそれに対応する参照となる中期染色体中の単一コピー配列がハイブリダイゼーション可能なハイブリダイゼーション中にブロックされずに十分残っている条件で、参照となる中期染色体の複数の座に結合し得る反復配列をラベルした対象DNAから十分に除去した後で、またあるいは適当なブロッキング試薬を用いたプレハイブリダイゼーションによって参照となる中期染色体中の反復配列に対応する結合部位をブロッキングした後で、またあるいは適当なブロッキング試薬を用いたプレハイブリダイゼーションによってラベルした対象DNA中の反復配列をブロッキングした後で、またあるいは前記反復配列に対するブロッキング試薬を含んだハイブリダイゼーションで、前記ラベルした対象DNAを参照となる中期染色体にin situ ハイブリダイゼーションする工程、
- e) 前記結合されてラベルされた対象DNA配列をもし必要であれば可視化する工程、
- f) 前記参照となる中期染色体上の位置の関数として前記結合されてラベルされた対象DNA配列から発生するシグナルの強度を測定したり測定したりする工程、

g) 前記中期染色体の異なる位置におけるシグナルの強度を比較することによって対象DNAの異なるDNA配列のコピー数を比較する工程であって、その位置のシグナル強度が大きいほどその位置に結合する対象DNAにおける配列のコピー数が大きくなるようなコピー数の比較工程、
からなることを特徴とする対象細胞あるいは細胞集団における異なるDNA配列のコピー数を比較する方法。

2. 参照となる中期染色体中の一つの位置に結合する前記対象DNA配列のコピー数がもう一つの位置に結合する配列のコピー数と比較され二つの位置におけるシグナルの強度比を算出することによって定量されることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のコピー数を比較する方法。

3. 請求の範囲第1項に記載されたコピー数を比較する方法がさらに、前記ハイブリダイゼーション混合物に、前記参照となる中期の染色体における配列に対して実質的に相等的な充分な数の反復配列を持つようなラベルされていない核酸を添加して、前記ラベルされた対象DNAによって参照となる中期の染色体における結合部位が飽和されるのを妨げることを特徴とするコピー数を比較する方法。

4. 前記参照となる中期の染色体がヒトの染色体でありかつヒトの遺伝子DNAを用いてあるいは高度にコピーされた反復配列を豊富に持つヒト遺伝子DNAを用いてプレハイブリダイゼーションされたものであり、また前記ヒト遺伝子DNAないし高度にコピーされた反復配列を豊富に持つヒト遺伝子DNAがハイブリダイゼーション

ンに含まれることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のコピー数を比較する方法。

5. 前記(i)に記載された工程及び/または(g)に記載された工程において、イメージ分析システムが用いられることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のコピー数を比較する方法。

6. 前記シグナル強度が平均よりも意味あるほどに大きい場合は前記対象細胞あるいは対象細胞集団において検出可能な増幅された配列が参照となる中期染色体上に存在し位置づけられていることを示し、一方前記シグナル強度が平均よりも意味あるほどに小さい場合は前記対象細胞あるいは対象細胞集団において欠失されている配列が存在し位置づけられていることを示していることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のコピー数を比較する方法。

7. 前記参照となる中期の染色体がアンテナ細胞ラインから得られることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のコピー数を比較する方法。

8. 次の(a)~(g)の工程、即ち、

- a) 対象細胞、あるいはいくつかの対象細胞集団からRNAを抽出する工程、
- b) 前記抽出された対象RNAをもし必要であれば増幅する工程、
- c) 前記対象RNAをラベルする工程、
- d) 参照となる中期染色体中の単一コピー配列に結合するラベルした対象RNA中の配列が十分にあり、またそれに対応する参照と

なる中期染色体中の単一コピー配列がハイブリダイゼーション前あるいはハイブリダイゼーション中にブロックされずに十分残っている条件下、参照となる中期染色体の複製の面に結合し得る反復配列をラベルした対象RNAから十分に除去した後で、またあるいは適当なブロックング液を用いたプレハイブリダイゼーションによって参照となる中期染色体中の反復配列に対応する結合部位をブロックした後で、またあるいは適当なブロックング液を用いたプレハイブリダイゼーションによってラベルした対象RNA中の反復配列をブロックした後で、またあるいは前記反復配列に対するブロックング液を含んだハイブリダイゼーションで、前記ラベルした対象RNAを参照となる中期染色体に *in situ* ハイブリダイゼーションする工程。

e) 前記結合されてラベルされた対象RNA配列をもし必要であれば可視化する工程。

f) 前記参照となる中期染色体上の位置の関数として前記結合されてラベルされた対象RNA配列から発生するシグナルの強度を測定したり測定したりする工程。

g) 前記中期染色体の異なる位置におけるシグナルの強度を比較することによって対象RNAの異なるRNA配列のコピー数を比較する工程であって、その位置のシグナル強度が大きいほどその位置に結合する対象RNAにおける配列のコピー数が増えるようなコピー数の比較工程。
からなることを特徴とする対象細胞あるいは細胞集団における異なるRNA配列のコピー数を比較する方法。

9. 一つの対象細胞あるいは一つの対象細胞集団にある異なるDN

A配列のコピー数を、もう一つの細胞あるいはもう一つの対象細胞集団にある実質的に同一の配列のコピー数に対して比較する方法であって、その方法が次の(a)~(g)の工程、即ち、

a) 対象細胞の両方、あるいはいくつかの対象細胞集団の両方からRNAを抽出する工程、

b) 前記抽出された両対象DNAをもし必要であれば増幅する工程、

c) 前記両対象DNAのそれぞれを別々にラベルする工程、

d) 参照となる中期染色体の複製の面に結合し得る反復配列をラベルした対象DNAから十分に除去した後で、またあるいは適当なブロックング液を用いたプレハイブリダイゼーションによって参照となる中期染色体中の反復配列に対応する結合部位をブロックした後で、またあるいは適当なブロックング液を用いたプレハイブリダイゼーションによってラベルした対象DNA中の反復配列をブロックした後で、またあるいは前記反復配列に対するブロックング液を含んだハイブリダイゼーションで、前記別々にラベルした対象DNAを参照となる中期染色体に *in situ* ハイブリダイゼーションする工程、

e) 前記別々に結合されてラベルされた対象DNA配列をもし必要であれば可視化する工程、

f) 前記参照となる中期染色体上の位置の関数として前記それぞれの対象DNA配列から発生するシグナルの強度、及びその相対強度を測定したり測定したりする工程、

g) 前記中期染色体に沿った異なる位置におけるシグナルの相対強度を比較する工程であって、一つの対象DNAによる位置でのシグナルの強度がもう一つの対象DNAによる位置でのシグナル強度

に比較して大きいほど、第1番目の対象細胞あるいは対象細胞集団のその位置に結合する配列のコピー数が第2番目の対象細胞あるいは対象細胞集団のその位置に結合する実質的に同一の配列のコピー数に比較して大きくなるようなシグナルの相対強度を比較する工程、からなることを特徴とするコピー数を比較する方法。

10. 一つの対象細胞あるいは一つの対象細胞集団中の異なるDNAのコピー数を、もう一つの対象細胞あるいはもう一つの対象細胞集団中の実質的に同一のコピー数に対して量的に比較する方法であって、その方法が、請求の範囲第9項に記載された工程(a)~工程(g)と次の工程、即ち、

f. 前記参照となる中期染色体に沿った位置を示す関数として前記結合されたそれぞれの対象DNAから発生するシグナルの強度を測定しかつその強度の比を算出することにより比のプロファイルを得る工程、及び

g. 前記参照となる中期染色体に沿った異なる位置間の比のプロファイルを量的に比較する工程であって、前記それぞれの位置における比のプロファイルが第1番目の対象細胞あるいは対象細胞集団中の位置に結合するDNA配列のコピー数の第2番目の対象細胞あるいは対象細胞集団中の実質的に同一の配列のコピー数に対する比に比例しているような量的な比較工程。
からなることを特徴とするコピー数を量的に比較する方法。

11. 一つの対象細胞あるいは一つの細胞集団に含まれる異なるDNA配列のコピー数のもう一つの細胞あるいはもう一つの細胞集団に含まれる実質的に同一のコピー数に対する比を測定する方法であ

って、その方法が、請求の範囲第10項に記載された前記(a)~(f)の工程と次の工程、すなわち、

h. 両方の対象細胞あるいは対象細胞集団にある目盛り配列 (calibration sequence) の平均コピー数を測定する工程であって、前記目盛り配列が実質的に参照となる中期細胞にある単一のコピー配列に固定される工程、及び

i. 前記目盛りの位置での比のプロファイルが前記(g)工程で測定された平均コピー数の比に等しくなるように、それによって前記参照となる中期細胞に沿った他の位置で標準化された比のプロファイルがその位置で結合するであろう二つの対象DNAにあるDNA配列のコピー数の比を量するよう、(f)工程で算出された比のプロファイルを標準化する工程。
からなることを特徴とするコピー数を比較する方法。

12. 請求の範囲第11項に記載された方法が更に、二つ以上の対象DNA中に含まれるDNA配列のコピー数の比を測定する工程を有し、その比較がそれぞれの対象DNAから得られるシグナルの間でペアワイズ (pairwise) を行ってなされることを特徴とするコピー数を比較する方法。

13. 請求の範囲第11項に記載された方法が更に、前記工程(g)の一つ以上の目盛り位置に対するコピー数を測定する工程と、

前記目盛り位置に比のプロファイルが最適に適合するように前記(f)工程で標準化を行う工程と
からなることを特徴とするコピー数を比較する方法。

14. テスト細胞あるいはテスト細胞集団中の異なるDNA配列のコピー数を比較する方法であって、その方法には、

請求の範囲第9項に記載された(a)～(f)の工程が適用され、そこでは対象細胞あるいは対象細胞集団の一つがテスト細胞あるいはテスト細胞集団であってこれに対しその他の対象細胞ないしその他の対象細胞集団が正常細胞ないし正常細胞集団であり、また

前記対象となる中期染色体に於いて異なる位置間の相対強度を比較する請求の範囲第9項に記載された(g)の工程が適用され、そこではある位置における相対強度が大きいほどその位置に結合する前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれる配列のコピー数が増加することを特徴とし、ただしこの特徴は性染色体には当てはまらず、性染色体における前記の比較は、正常の対象細胞あるいは正常の対象細胞集団にある常染色体にある配列のコピー数に対する性染色体にある配列のコピー数の既知の量を計測することを必要とするものである、

ことを特徴とするコピー数を比較する方法。

15. テスト細胞あるいはテスト細胞集団中の異なるDNA配列のコピー数を比較する方法であって、その方法には、

請求の範囲第10項に記載された(a)～(g)の工程が適用され、そこでは対象細胞あるいは対象細胞集団の一つがテスト細胞あるいはテスト細胞集団であってこれに対しその他の対象細胞ないしその他の対象細胞集団が標準細胞ないし標準細胞集団であり、この標準細胞ないし標準細胞集団における前記対象となる中期染色体の異なる位置に結合するDNA配列の既知のコピー数が周知であって、次の工程、即ち、

列のコピー数を測定する工程、及び、

1. 前記参照となる中期染色体にある目盛り配列の位置に標準化されかつ調節された比のプロファイルが前記(h)工程で測定された目盛り配列のコピー数と等しくなるように、更にもう一つの位置に標準化されかつ調節された比のプロファイルの値が前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団においてその位置に結合するDNA配列のコピー数と等しくなるように調節された比のプロファイルを標準化する工程、

からなることを特徴とするコピー数の比を決定する方法。

18. 前記二つ以上の目盛り配列が用いられ、そして調節された比のプロファイルが目盛り配列の全体のコピー数に最適に適合するように標準化されることを特徴とする請求の範囲第17項に記載のコピー数の比を決定する方法。

19. 一つの対象細胞あるいは一つの対象細胞集団にある異なるRNA配列のコピー数を、もう一つの細胞あるいはもう一つの対象細胞集団にある実質的に同一の配列のコピー数に対して比較する方法であって、その方法が次の(a)～(g)の工程、即ち、

a) 対象細胞の両方、あるいはいくつかの対象細胞集団の両方からRNAを抽出する工程、

b) 前記抽出された両対象RNAをもし必要であれば増幅する工程、

c) 前記両対象RNAのそれぞれを別々にラベルする工程、

d) 参照となる中期染色体の複数の座に結合し得る反復配列をラベルした対象RNAから十分に除去した後で、またあるいは適当な

e) それぞれの位置に結合している標準細胞あるいは標準細胞集団にあるDNA配列の周知のコピー数に比のプロファイルをかけ算することによって前記対象となる中期染色体に於いてそれぞれの位置での比のプロファイルを調整する工程、

h. 前記対象となる中期染色体に於いて異なる位置で前記調整された比のプロファイルを比較する工程であって、ある位置における調整された比のプロファイルが大きくなるほどそこに結合しているテスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれているDNA配列のコピー数が増加することを特徴とする比較工程、

16. テスト細胞あるいはテスト細胞集団における異なるDNA配列のコピー数の比を決定する方法であって、その方法には、請求の範囲第15項に記載された工程(a)～工程(g)が適用され、かつその方法では、前記対象となる中期染色体上のある一つの位置に結合する前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれるDNA配列のコピー数のもう一つの位置に結合する配列のコピー数に対する比を、第1の配列の位置に調節された比のプロファイルを前記第2の配列の位置における比のプロファイルで割ることによって算出されることを特徴とするコピー数の比を決定する方法。

17. テスト細胞あるいはテスト細胞における異なるDNA配列のコピー数の比を決定する方法であって、その方法には、請求の範囲第15項に記載された工程(a)～工程(g)が適用され、

h. 前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれ、参照となる中期細胞にある単一のコピー配列に実質的に同定される目盛り配

列のコピー数を測定する工程、及び、

1. 前記参照となる中期染色体にある目盛り配列の位置に標準化されかつ調節された比のプロファイルが前記(h)工程で測定された目盛り配列のコピー数と等しくなるように、更にもう一つの位置に標準化されかつ調節された比のプロファイルの値が前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団においてその位置に結合するDNA配列のコピー数と等しくなるように調節された比のプロファイルを標準化する工程、

からなることを特徴とするコピー数の比を決定する方法。

18. 前記二つ以上の目盛り配列が用いられ、そして調節された比のプロファイルが目盛り配列の全体のコピー数に最適に適合するように標準化されることを特徴とする請求の範囲第17項に記載のコピー数の比を決定する方法。

19. 一つの対象細胞あるいは一つの対象細胞集団にある異なるRNA配列のコピー数を、もう一つの細胞あるいはもう一つの対象細胞集団にある実質的に同一の配列のコピー数に対して比較する方法であって、その方法が次の(a)～(g)の工程、即ち、

a) 対象細胞の両方、あるいはいくつかの対象細胞集団の両方からRNAを抽出する工程、

b) 前記抽出された両対象RNAをもし必要であれば増幅する工程、

c) 前記両対象RNAのそれぞれを別々にラベルする工程、

d) 参照となる中期染色体の複数の座に結合し得る反復配列をラベルした対象RNAから十分に除去した後で、またあるいは適当な

20. 対象細胞あるいは対象細胞集団に含まれるある配列あるいは配列群の増幅度を検出する方法であって、

その方法には、請求の範囲第1項の工程(a)～工程(e)が適用され、そこではin situ ハイブリダイゼーションがアンテナ細胞

発 明 の 分 野

本発明は、一般的には細胞遺伝学分野に、そしてより特定すると分子細胞遺伝学分野に属する。それは、参照ゲノムにおける配列の所在の一つの関数として、一つの対象細胞や細胞集団における異なった核酸配列の相対的コピー数を決定したり、いくつかの細胞や細胞集団における実質的に固有の配列の核酸配列コピー数を比較する方法に関連している。たとえば、この発明の方法は、一つまたはそれ以上の対象ゲノム（たとえば、一つの細胞系や完形性細胞の一部分からの多くの細胞）や部分における核酸配列の相対コピー数を、参照ゲノム（たとえば、正常なヒト中期スプレッド）におけるそれらの配列の所在の一つの関数として決定する手段を提供する。さらに、この発明は、一つの対象細胞や細胞集団における核酸配列の絶対コピー数を決定する方法を提供する。

この中にある例はヒト細胞に関連していたり、その記述はヒトへの関わりで第一に向いているけれども、本発明の概念は、どんな植物や動物からのゲノムに対しても適用できる。意味ある解析のためには比較されるゲノムは、実質的に固有の配列と見なしうに足る類似性を持つことのみ必要である。たとえば、ヒトゲノムやその他の霊長類のゲノムは、本発明の方法に従って比較されうであろう。

発 明 の 背 景

染色体異常は、遺伝的疾患、変性性の病状、そして癌性の病状の原因として知られている薬剤にさらされること、とくに癌、Germ

as "現代のヒト染色体研究" American Scientist, 58:182-203 (1970); Yunis "ヒト新生物形成の染色体的基礎" Science 211:127-136 (1983); German "染色体破壊の臨床的意味" Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents, Berg, Ed., pp. 85-10 (Academic Press, New York, 1979) に関連している。染色体異常は、次のようないくつかのタイプがある。余分なあるいは不足した特定の染色体、余分なあるいは不足した染色体の部分（断片的な二重性や欠損）、破損、環形成や染色体再配列等である。染色体のまたは遺伝子の再配列は、転位（ある染色体から別の染色体にある断片が移動すること）、ダイセントリクス（二つのセントロメアを持った染色体）、反転（染色体断片の方向性の反転）、増幅、欠損を含んでいる。

検出される染色体異常は、250人のヒトの誕生毎に一回の程度でおこる。染色体物質の欠損や付加を含んだ異常は、生物の遺伝子バランスをかえたり、胎児期の死や重度の精神病的しくは身体的欠陥につながる。ダウン症候群は、正常なら二つのところが21番目の染色体の三つのコピーをもつことによって引き起こされる。この症候群は、異数性と呼ばれる異常な染色体数によって起こる状態の一つの例である。ダウン症候群は、21番目の染色体におけるサブリージョンの断片的な複製（たとえば 11q13）、そしてそれは21番目の染色体またはその他の染色体に存在しうるものであるが、そのような複製によってもまた引き起こされる。エドワード症候群（18+）、パトウ症候群（13+）、ターナー症候群（XO）そしてクラインフェルター症候群（XXY）は、最もありふれた数的異常の例である。[Epstein, 染色体のインバランスの結晶: Principles, Mechanisms and Models (Cambridge Univ. Press 1986): fac

obs. Am. J. Epidemiol. 105:189 (1977); and Lubs et al., Science 163: 435 (1970).]

細胞芽細胞腫 (del 13q14)、ブレイダー-ウィリアム症候群 (del 15 q11-q13)、ウィルム腫瘍 (del 11p13) やクリドゥシャット症候群 (del 5p) は、構造的異常に伴った重要な病気の例である [Hors and Fraser, Medical Genetics: Principles and Practice, (Lee and Febiger (1983).)].

人類の医学的研究における切迫した目的の一つは、健康上の障害を起こすような遺伝子的異常の発見である。多くの場合、特定の遺伝子や決定的な診断的マーカーの位置にたいする手がかりは、異常なコピー数が存在するゲノムの部分の両端から得られる。たとえば、出生前の診断では、胎に示したように、完全なゲノムの余分なまたは欠損したコピーは、最も頻繁に起きている遺伝子的病状である。胎において、染色体そのものや染色体断片のコピーの欠損や多重複製、そしてゲノムの特定部位のより高レベルの増幅は、普通に見ることである。

そのような細胞遺伝学的情報の多くは、光学顕微鏡による染色体の研究以来、この数十年間にわたって得られてきた。過去30年間に、細胞遺伝学者たちは、問題となる遺伝子の座位に対するヒントを少しずつ集めようとして、繰り返して起こる異常の単位を決めるための悪性腫瘍細胞の染色体を調べてきた。たとえば細胞遺伝学的分析が、染色体のなかにDNAが複線にパッキングされていることによって、ゲノムに隠れるものであっても、この努力は、重要な情報に結び付いてきている。そのような伝統的細胞遺伝学の強みは、反転や転位、同時に欠損や多重複製、それに染色体そのものや部分の増幅などのような構造的異常が解るような、完全なゲノムの既知を

一度に与えることである。クローニングや詳細な分子的分析の発展に伴って、異なり過ぎる転位の部位は、慢性骨髄性白血病 (CML) における BCR-ABL フュージョンなどのようなキメラ遺伝子の形成に注目するようになって、認識されてきている。欠損は、腫瘍抑制遺伝子の座位を何回も増殖することによって、認識されるようになってきている。そして、増幅は、過剰に発現した遺伝子を推測することによって、認識されてきている。

遺伝子スクリーニングや生物学的検査法の従来の手順は、該型の分析を含んでいる。該型は、ある個体や個体の近縁グループの持つ固有の染色体構成であり、たいてい分裂中期における染色体の数と形態の両方によって定義される。それは、染色体数、個体の染色体型のコピー数 (たとえば、X染色体のコピー数)、そして染色体の形態学、たとえば長さ、動原体インデックス、非結合性もしくはその様なものによって測定されるもの、などからなる。該型は、従来では生物の中期、前期または、さもなくば凝縮した (たとえば、成熟前染色体凝縮) 染色体を化学的に染色することによって決定されている。最近になって、細胞の中で分散した状態にあって目に見える染色体の境界が欠如している前期の染色体を視覚化できるようにまで、凝縮した染色体が用いられている。凝縮した染色体における長軸方向のパターン、即ち一般的にはバンドとして参照されるパターンを示す化学染色を基調にした多くの細胞遺伝学的技術が普及してきている。生物の各々の染色体のバンドパターンは、各々の染色体型の間違いのない同定をたいてい可能にする [Latt, "中期染色体構成の光学的研究" *Annual Review of Biophysics and Biochemistry*, 5:1-37 (1976)]。

残念ながらそのような従来のバンド分析は、細胞培養や高度な品

質の中期スプレッドの調製を必要としている。そしてそれは、多くの時間と多大な労力を必要とし、困難を伴うことが多く、即ち不可能である。例えば、多くのタイプの腫瘍細胞は培養が困難であり、培養された細胞は、もとの腫瘍細胞集団の代表であるかはっきりしない。培養可能な胎児の細胞は、分析するために充分な中期の細胞を得るのに数週間かけて増殖する必要がある。

過去十年にわたり、無細胞の細胞核の解析を可能にする *in situ* ハイブリダイゼーションという方法が、細胞遺伝学として普及してきている。染色体の動原体、染色体全体、そして遺伝子の大きさはどの染色体断片に対するプローブが、開発されてきている。そのようなプローブを用いて、特異的な異常の有無が、きわめて効果的に決定される。しかしながら、多くの可能な異常を試験したり、ある病気で変わるゲノムの新たな部位を探索ことは単純で過酷である。

本発明である比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) [他の呼び名の一つとして以前は、コピーレシオリバースサイトジュネティクス (CRRS) と呼ばれた] は、従来の細胞遺伝学的技術の多くの限界を克服する強力な方法を提供する。たとえば腫瘍の細胞遺伝学や出生前診断の分野で CGH が適用されると、それが、対象となる腫瘍細胞や胎児の細胞のゲノム、または腫瘍細胞集団や多くの胎児の細胞からの典型的な細胞のゲノムの中のどこかに複製配列の異常コピー数があるかどうかを、それらの細胞の凝縮した染色体スプレッドを調製せずに決定する方法を提供する。そのうえ、複製配列の異常なコピー数や特異的な増幅や欠損を含んだ細胞遺伝学的な異常は、完全なゲノムや部分の素早い検索をする本発明の方法によって見つけることができる。より明確に言えば、CGHは、一つま

たはそれ以上の対象となるゲノムや部分の複製配列の頻度を参照ゲノムに関連して比較マッピングする方法を提供する。それは、参照ゲノム (たとえば、正常ヒト細胞のゲノム) に存在する複製配列の部位の同定として、ひとつまたはそれ以上の対象ゲノム (例えば、癌細胞) におけるその複製配列の相対的コピー数の決定を可能にする。

遺伝子増幅は、数あるメカニズムの中の一つであり、それによって特異的なタンパク質の量が増える必要があれば、細胞は複製形の発現を促えることができるのである。例として、発生の過程 [Spradling and Mahowald, *PNAS (USA)*, 77:1398-1400 (1980); Glover et al., *PNAS (USA)*, 79:2947-2951 (1982)]、もしくは環境の変化に際しての特異的なタンパク質量の増大は細胞障害性の薬剤に対する抵抗性を考えうること [Molera et al., *J. Biol. Chem.*, 265: 7024-7028 (1990); Beach and Palmer, *PNAS (USA)*, 78:2110-2114 (1981)] がある。

遺伝子増幅の分析のためのサゲンアナリシスや関連した従来の技術の主要な問題点は、単に特異的な部位だけが、分析されないゲノムの圧倒的多数をそのままにして、研究されていることである。一方、従来の細胞遺伝学的研究においては、ゲノムのほぼ全範囲を提供してはいるものの、増幅が起こっているであろう遺伝子についてはほとんど情報を提供していない。しかしながら、本発明の手法によれば、それらの問題を克服することができる。本発明は、増幅されたり欠損したりしているゲノムの全下の領域の正常な染色体の位置を明らかにする目的で使うことができる。そして、その検出できる領域の大きさは、用いる顕微鏡の解像度と凝縮した染色体の DNA の状態とによってのみ決められる。そのうえ、本発明は、他

の利用として、遺伝子増幅や欠損、それに腫瘍の発生、進行ならびに以前よりもさらに徹底的な治療に対する応答におけるそれらの役割を研究するのに使うことができる。CGHの方法は、充分に迅速でかつ簡単に行うことができ、例えば多くの腫瘍から得られるようなおびただしい数の対象となる複製が、遺伝子の増幅や欠損を対象とする研究において分析されうる。

充実性腫瘍での核型のヘテロジネイティーは、顕著に見られる。普通起こる染色体変化の中期スプレッドの解析による同定は、従来のバンドアナリシスを用いる限り、再配列の複雑さや中期染色体の調製を高品質でおこなうことができないために、しばしば困難あるいは不可能となる。CGHは、中期のスプレッドの調製をせずに腫瘍の複製を調べることでできるという点でその量を克服する。CGHが、単一細胞において複製を増幅することによっておそらく実施されうることから、CGHは、腫瘍の異なった細胞集団からの典型的な細胞を研究することによって腫瘍のヘテロジネイティーを研究する目的に使うことができる。これは別に、一つの腫瘍のたくさんの細胞から大量抽出過程で得られた腫瘍の複製に対する CGHは、明かなヘテロジネイティーのなかで普遍一貫性を示しうる。例えば、同じ増幅された配列は、一つの腫瘍細胞において均質に染色された領域 (HSR) や二重減少染色体 (DM) として、しかしもう一つの腫瘍細胞では染色体断片の伸張として現れるだろう。さらに、明かなランダムさから生じる秩序が、CGHを使用することによってわかるかもしれない。

Montgomeryらは、*PNAS (USA)*, 80:5724-5728 (September 1983)、らは、腫瘍細胞系から調製された Cot 部分 DNA (高頻度複製配列、低頻度複製配列や単一コピー配列は充分にとりのぞかれた Co

1部分)を前述の細胞系からの中期スプレッドにハイブリダイゼーションすることに関心を持っている。Montgomeryらは基本的に、腫瘍細胞系ゲノムにかなり高度に増幅されてもどるような腫瘍細胞系からの複製配列の位置をマッピングした。

一つの例の全てのゲノムDNAは、ハイブリッド細胞で高頻度反復配列からのシグナルに基づいて、その型とある異なった型の染色体とを区別するためにin situハイブリダイゼーションにおいて使われている [Pinkel et al., *PNAS (USA)*, 83: 2936 (1986); Nanno et al., *Hum. Genet.*, 71: 281 (1985); and Burnas et al., *Somatic Cell Molec. Genet.*, 11: 571 (1985).]。

Landegrenらは、*Hum. Genet.*, 71: 365-370 (1987)、Cot-1 DNAによって高頻度反復配列をブロックすることによって、A1uやKpn断片のような高頻度反復配列をコスミドでクローンされた完全なゲノム配列から除去した。その結果得たプローブは、in situハイブリダイゼーションに使われる。

ヨーロッパ特許明細書No. 430,402 (1991年6月5日published)には、染色体特異的ペインティングの方法と構成、つまり、高度に増幅した複製プローブを用いた複製配列に基づく染色体の染色の方法と構成が記載されている。一般的に、染色体特異的ペインティング方法において、ターゲットの複製配列に特異的でない反復配列は、ラベルされていないゲノムDNAやCot-1 [Bethesda Research Laboratory, Gaithersburg, MD (USA) から商業的に入手できる] のような高頻度反復配列を多くもつDNAによってブロックすることによって、ハイブリダイゼーション阻害液やハイブリダイゼーション能力を失った溶液から除かれる手法がよくとられる。Pinkelら *PNAS (USA)*, 83: 9138-9142 (1986)もまた、国際公開公報No. 90/05

189 (1990年5月31日に公開、題名は、"in situ 抑制ハイブリダイゼーションならびに利用"である)において記載されたのと同様の染色体特異的ペインティングの側面を記述している。

染色体特異的反復配列プローブや染色体特異的ペインティングプローブは、in situで中期のスプレッドにハイブリダイゼーションされるのと同様に、中期の核にもハイブリダイゼーションされ、また個人のターゲットゲノム遺伝子の状態について情報を提供する。そのようなハイブリダイゼーションの阻害、すなわち阻害点、細胞遺伝学的情報がプローブが結合した領域から提供されるだけであるということである。そのようなハイブリダイゼーションは、特定の異常、たとえば特定遺伝子の欠損やその他の異常の一つとして重要であるか否かを決定するには極めて有用である。しかし、それは、目下知られていない異常をある領域上で領域に基づいて調べるには困難を招く。

不明な遺伝子的異常を探索する方法は、同じようにたくさんの努力を必要とする。例えば、腫瘍細胞のヘテロ接合性の欠損を探索することは、腫瘍や正常細胞DNAのサザンブロットに対する多くのプローブを用いたハイブリダイゼーションをおこなうことを必要とする。CGHは、細胞遺伝学的技術の多くの問題を克服する方法を提供する。

Saint-Rufetら *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2: 18-26 (1990)は、乳がんの研究から乳がんの発生には遺伝子物質の増幅がよく起こり、多分重要なイベントであるけれども、そのような増幅を受ける関係した遺伝子は、普通乳がんで重要だと考えられている原癌遺伝子と一致しているようには見えなく、なお不明のままであると結論づけた。

腫瘍細胞のHSRは、正常細胞では増幅されない遺伝子が存在しないところで、きわめてよく知られるので、標準的な細胞遺伝学は、遺伝子の固定を手助けするような如何なる情報も与えない。一方、CGHは、それらの固定のための主要なステップとして、それらを正常遺伝子においてマッピングすることができる。

Durillanyら *Cancer Genet. Cytogenet.*, 43: 203-217 (1990)は、ヒト乳がんは、最も頻発する悪性腫瘍の一つであるけれども、多分それらの高度な変異性とそれらの解析の多大な困難のために、細胞遺伝学的データは乏しい、と報告している(203ページに)。彼らの、"どの異常が最も頻発に起きるか、そして特に腫瘍の進行の初期において(P. 203)"、を決めるための相対的に単純な装置を持つ80例の研究において、彼らは、"トリソミー 1qやモノソミー 16qは、乳がんにおける初期の染色体変化であり、一方他の欠損や8qの増加は、明らかに二次的イベントである"と結論した [Abstract, P. 203]。Durillanyらは、さらに腫瘍抑制遺伝子内の欠損は、"乳がんの腫瘍進行を特徴づける"と述べている(216ページに)。

多くの充実性腫瘍は、たとえば乳がんの様な、いくつかの遺伝子的異常を経て発生から転移へ進行すると信じられている。[Smith et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 18 Suppl. 1: 58-74 (1991); van de Vijver and Nuisen, *Biochem. Biophys. Acta*, 1072: 33-59 (1991); Sato et al., *Cancer Res.*, 52: 7184-7189 (1990).]。そのような遺伝子的異常は、それが蓄積するにつれて、増殖的な優勢、遺伝子の不安定性や薬剤耐性を迅速にもたらす様な付随した能力、そして盛んな血管新生、プロテオシスや転移を招く。その遺伝的異常は、劣性の"腫瘍抑制遺伝子"または、優勢に作用する癌遺伝

子のどちらかに影響するだろう。ヘテロ接合性の喪失につながる欠損や組換えは、突然変異した腫瘍抑制対立遺伝子をむき出しにすることによって、腫瘍の進行の主要な役割を演じていると信じられて

いる。

ヒト充実性腫瘍に関連した優勢にはたらく遺伝子は、過剰発現や変異された発現によって効果を現す。遺伝子の増幅は、遺伝子発現の活性化につながる一つのありふれたメカニズムである [Stark et al., *Cell*, 75: 901-908 (1989).]。細胞遺伝学的な研究の結果は、有意な増幅は、ヒト乳がんの50%異常でおこることを示している [Saint-Ruf et al., *ibid.*]. 癌遺伝子のパラエティは、ヒト悪性腫瘍の中で増幅されることが発見されてきている。ヒトの腫瘍の細胞性腫瘍遺伝子の増幅の例は、以下の第1表に示されている。

(以下 空白)

第 1 表

増幅された 遺伝子	組織	増幅の 程度	DMやHSR の存在
c-myc	前骨髄性白血病細胞系、HL-60	10x	+
	小細胞肺癌細胞系	5-20x	?
H-myc	原発性神経芽細胞腫 (ステージIIIとIV) または神経芽細胞腫細胞系	5-100x	+
	膀胱癌細胞系と原発性癌腫	10-100x	+
	小細胞肺癌細胞系と癌腫	50x	+
l-myc	小細胞肺癌細胞系と癌腫	10-30x	?
c-myb	急性骨髄性白血病	5-10x	?
	大腸癌細胞系	10x	?
c-erbB	肺癌癌腫	30x	?
	原発性癌腫	?	?
c-f-ras-1	肺、大腸、膀胱や直腸の原発性癌	4-30x	?
H-ras	乳癌細胞系	5-10x	?

出典: Vande, *Annu. Rev. Genetics*, 18:553-572(1984) [Watson et al., *Molecular Biology of the Gene* (4th ed., Benjamin/Cummings Publishing Co.(1987)より引用]

癌腫抑制遺伝子を含む染色体の欠損は、充実性腫瘍の発生と進行に必要な役割を演ずるだろう。癌腫芽細胞腫腫瘍抑制遺伝子 (Rb-1) は、染色体13q14に位置し、最も広範に欠けられている腫瘍抑制遺伝子である [Friend et al., *Nature*, 323: 643 (1986); Lee et al., *Science*, 235:1334 (1987); Fung et al., *Science*, 235:

1657 (1987)]。そのRb-1遺伝子産物は、105 KDaの核内の核蛋白質であり、細胞周期の調節に明らかに重要な役割をしてい [Lee et al., *SVPR* (1987); Rowe et al., *PNAS* (USA), 87:5883 (1990)]。Rb蛋白質の発現の欠損または喪失は、点突然変異または染色体欠損のどちらかを通じて両方の遺伝子の対立遺伝子の不活性化によって引き起こされる。Rb-1遺伝子の欠損は、網膜芽細胞腫 [Friend et al., *SVPR* (1986); Lee et al., *SVPR* (1987); Fung et al., *SVPR* (1987)] だけでなく骨肉腫 [Friend et al., *SVPR* (1986)], 小細胞肺癌 [Hansel et al., *Cancer Res.*, 50:3087 (1990); Rygaard et al., *Cancer Res.*, 50:5312 (1990)] や乳ガン [Lee et al., *Science*, 241:213 (1988); T'Ang et al., *Science*, 241:263 (1988); Varley et al., *Oncogene*, 4:725 (1989)] のような悪性腫瘍でもまた存在していることが明らかにされてきた。網膜芽細胞腫断片長多型 (RFLP) の研究は、Rb-1遺伝子の対立遺伝子のひとつが全体の染色体欠損に基づいて失われることを示唆することによって、そのような腫瘍のタイプは13qでヘテロ接合性を頻りに喪失してしまっていることを示してきた [Borecock et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 45:12 (1990)]。

第三染色体の短臂の欠損は、いくつかの癌、例えば、小細胞肺癌、胃癌の癌または肺癌の癌、に関係している。一つまたはそれ以上の短臂上の腫瘍抑制遺伝子は、第三染色体 (c.h. 3p) のp領域に位置していることが主張されてきている。 [Minna et al., *Symposium on Quantitative Biology*, Vol. 11:843-853 (SCB Lab 1986); Cohen et al., *J. Nat. Med.*, 10:592-595 (1979); Bergerson et al., *Cancer Res.*, 49:1390-1396 (1989); Wang-Peng et al., *Cell. Genet. Cytogenet.*, 11:91-106 (1984); and Trent et al., *Can. Genet. Cytogenet.*, 11:153-161 (1983)]

153-161 (1983)]

先に示された増幅されたまたは欠損した遺伝子のコレクションは、完全ではない。二重微小 (DMs) や物質染色体領域 (HSRs) のような増幅の細胞遺伝学的証拠を示すような、Saito-Rufらの細胞での増幅遺伝子増幅の研究 (SVPR) は、増幅された遺伝子は、ほとんどの場合癌遺伝子として知られていないことを明らかにした。 Dutrillauxらは、(SVPR)最も頻発する悪性腫瘍、つまり乳ガンに対する細胞遺伝学データは、不足していることを明らかにした。

充実性腫瘍の発生を引き起こす遺伝子の欠損の発見は、困難なことであった。癌腫を決めることは、高品質な中期の癌腫の組織と染色体変化の複雑さによって妨げられた [Teyssier, J.R., *Cancer Genet. Cytogenet.*, 37: 103 (1981)]。単純された腫瘍DNAの分子的な遺伝子の研究は、多くの成果をあげ、対立遺伝子の喪失、突然変異や増幅 [Pearson et al., *Cell*, 61:759(1990); Sato et al., *Cancer Res.*, 50:7184(1990); Altitalo et al., *Adv. Cancer Res.*, 47: 235 (1985); and Schwab and Almer, *Genes Chrom. Cancer*, 1:181(1990)] の通常の領域の検出を可能にできたけれども、そのような分子的な方法は、一度に一つの特異的な遺伝子や染色体領域をターゲットにすること、そして大多数の検査しないゲノムを区別することによって、とくに注目される。

それで、増幅されたりまたは欠損した遺伝子の同定をしたり、腫瘍、特に進行や侵入性を見極めるようなより多くの細胞遺伝学データを提供する一つの研究ツールは、腫瘍細胞遺伝学において必要とされる。CGHは、そのような一つの分子細胞遺伝学の研究ツールをもたらす。

一度にただひとつの癌をターゲットにする断片長多型

(RFLP) による対立遺伝子喪失の研究全般において、一四のハイブリダイゼーションで全ゲノムをスクリーニングする能力は、紛れもない利点である。RFLPもまた、多型のプローブの有用性や得られる情報量によって限定される。

CGHは、一回のステップで完全なゲノムのコピー数検定を提供することができる点で、腫瘍の遺伝子的解析を容易にする。腫瘍DNAの増幅や喪失のある領域は、正常染色体上に直接マッピングされる。CGHによる原発性腫瘍とその転移との比較は、癌の進行に関して多くの情報を与えるはずである。類似的に、それらの腫瘍とは異なった別のゲノムは、CGHによって研究される。

発 明 の 要 約

コンパラティブ ゲノミック ハイブリダイゼーション (CGH) では、一個のサンプルから得られる異なるDNAあるいはRNAのコピー数を比較する目的で、あるいは一個のサンプル中に含まれる異なるDNAあるいはRNA配列のコピー数をもう一つのサンプル中に含まれる実質的に同一の配列のコピー数と比較する目的で、*in situ* ハイブリダイゼーションのテクニックを利用している。CGHを有用に利用する多くの応用例では、DNAあるいはRNAは対象細胞あるいは対象細胞集団から単離される。比較は定性的あるいは定量的に行うことができる。かりに一個の配列あるいは数個の配列についての絶対的なコピー数が既知、即ち決定されているならば、無知あるいは細胞集団のゲノム全体のDNA配列の絶対的なコピー数を決定するのを可能にするような手法を開示することができる。このような異なる配列を互いに識別するには、対象となるゲノム、即ち通常はある種類の核の場合以外の中期染色体にハ

ハイブリダイゼーションを行った際に、それらの配列が結合する部位の位置が異なることが利用される。コピー数に関する情報は、参照となるゲノム上の異なる位置に存在するハイブリダイゼーションによるシグナル強度を比較することから得ることができる。

対象DNAの分析を行う目的で、ここに例示したようなCGHにおいて二つの代表的な基本的アプローチが行われる。第1番目のアプローチの一例では、対象細胞あるいは対象細胞集団からゲノムDNAが単離され、ラベリングされてから、参照となる染色体、即ち通常は中期染色体へのハイブリダイゼーションが行われる。また第2番目のアプローチの一例では、二つ以上の対象細胞あるいは細胞集団からゲノムDNAが単離され、それぞれ別々のラベルを付与してから参照となる染色体、即ち通常は中期染色体へのハイブリダイゼーションが行われる。

本発明のCGH法は、定性的手法としてもあるいは定量的手法としても応用することができる。CGHをうまく応用すれば、一個あるいは複数の対象細胞や対象細胞集団から得られるDNA配列を分析することができる。例えば、腫瘍や胎児組織などの臨床試料についてDNA配列を分析することができる。

CGHの利用において最も意味ある点は、例えば癌や先天的な欠陥などの病気の一因となる配列コピー数の変化が生じた場合、正常細胞中にその変化のある領域を見いだすことにある。例えば、コピー数の増加した領域では癌遺伝子が含まれている可能性があるし、またコピー数の減少した領域では腫瘍抑制遺伝子が含まれている可能性がある。

代表的なCGH法は、対象細胞あるいは対象細胞集団に存在する異なるDNA配列のコピー数を比較するための方法であって、その

方法は次の工程(a)～(g)よりなる。即ち、

a) 対象細胞、あるいはいくつかの対象細胞集団からDNAを抽出する工程と、

b) 前記抽出された対象DNAをもし必要であれば増幅する工程と、

c) 前記対象DNAをラベルする工程と、

d) 参照となる中期染色体中の単一コピー配列に結合するラベルした対象DNA中の配列が十分にあり、またそれに対応する参照となる中期染色体中の単一コピー配列がハイブリダイゼーション前あるいはハイブリダイゼーション中にブロッキングされずに十分残っている条件下で、参照となる中期染色体の複数の箇所に結合し得る反復配列をラベルした対象DNAから十分に除去した後で、またあるいは適当なブロッキング検疫配列を用いたプレハイブリダイゼーションによって参照となる中期染色体中の反復配列に対応する結合部位をブロッキングした後で、またあるいは適当なブロッキング検疫を用いたプレハイブリダイゼーションによってラベルした対象DNA中の反復配列をブロッキングした後で、またあるいは前記反復配列に対するブロッキング検疫を含んだハイブリダイゼーションで、前記ラベルした対象DNAを参照となる中期染色体に $in situ$ ハイブリダイゼーションする工程と、

e) 前記結合されラベルされた対象DNA配列をもし必要であれば可視化する工程と、

f) 前記結合されラベルされた対象DNA配列から発生するシグナルの強度を参照となる中期染色体に付った位置を示す役として観察したり測定したりする工程と、

g) 前記中期染色体の異なる位置におけるシグナルの強度を比較

することによって対象DNAの異なるDNA配列のコピー数を比較する工程であって、その位置のシグナル強度が大きいほどその位置に結合する対象DNAにおける配列のコピー数が大きくなるようなコピー数の比較工程である。なお、対象となる検疫がRNAである場合にも同様のアナログ手法を行うことができる。

更にこの明細書では、二つまたはそれ以上の対象細胞をCGHによって分析する方法についても記述されている。ここで具体的に説明している方法においては、対象細胞は対象細胞あるいは対象細胞集団から得られるDNA配列である。対象細胞がRNAである場合にも、このアナログ手法を適用することができる。このような具体例の方法は、一つの対象細胞あるいは一つの対象細胞集団にある異なるDNA配列のコピー数を、もう一つの細胞あるいはもう一つの対象細胞集団に存在する実質的に同一の配列のコピー数に対して比較するための方法であって、次の(a)～(g)の工程からなる。即ち、

a) 対象細胞の両方、あるいはいくつかの対象細胞集団の両方からRNAを抽出する工程と、

b) 前記抽出された両対象DNAをもし必要であれば増幅する工程と、

c) 前記両対象DNAのそれぞれを別々にラベルする工程と、

d) 参照となる中期染色体の複数の箇所に結合し得る反復配列をラベルした対象DNAから十分に除去した後で、またあるいは適当なブロッキング検疫を用いたプレハイブリダイゼーションによって参照となる中期染色体中の反復配列に対応する結合部位をブロッキングした後で、またあるいは適当なブロッキング検疫を用いたプレハイブリダイゼーションによってラベルした対象DNA中の反復配列

をブロッキングした後で、またあるいは前記反復配列に対するブロッキング検疫を含んだハイブリダイゼーションで、前記別々にラベルした対象DNAを参照となる中期染色体に $in situ$ ハイブリダイゼーションする工程と、

e) 前記結合され別々にラベルされた対象DNA配列をもし必要であれば可視化する工程と、

f) 前記それぞれの対象DNA配列から発生するシグナルの強度及びその相対強度を、参照となる中期染色体に付った位置を示す役として観察したり測定したりする工程と、

g) 前記中期染色体に付った異なる位置におけるシグナルの相対強度を比較する工程であって、一つの対象DNAによる位置でのシグナルの強度がもう一つの対象DNAによる位置でのシグナル強度と比較して大きいほど、第1番目の対象細胞あるいは対象細胞集団のその位置に結合する配列のコピー数が第2番目の対象細胞あるいは対象細胞集団のその位置に結合する実質的に同一の配列のコピー数と比較して大きくなるようなシグナルの相対強度を比較する工程である。

この明細書に更に記載されている方法は、一つの対象細胞あるいは一つの対象細胞集団中の異なるDNAのコピー数を、もう一つの対象細胞あるいはもう一つの対象細胞集団中の実質的に同一のコピー数に対して直接的に比較する方法である。この代表的な方法は、すぐ上で説明したところの工程(a)～工程(e)と、次の工程(f)及び(g)よりなる。即ち、

1. 前記参照となる中期染色体に付った位置を示す関数として前記結合されたそれぞれの対象DNAから発生するシグナルの強度を測定しかつその強度の比を算出することにより比のプロファイルを

得る工程、及び

g. 前記参照となる中期染色体に於いた異なる位置間の比のプロファイルを量的に比較する工程であって、前記それぞれの位置における比のプロファイルが第1番目の対象細胞あるいは対象細胞集団中の位置に結合するDNA配列のコピー数の第2番目の対象細胞あるいは対象細胞集団中の実質的に同一の配列のコピー数に対する比に比例しているような量的な比較工程である。

前記の代表的な方法はさらに、二つ以上の対象DNA中に含まれる異なるDNA配列のコピー数を比較する工程を有しており、この工程での比較は、それぞれの対象DNAから得られるシグナルの間でペアワイズ(pairwise)を行ってなされる。

この発明はさらに、一つの対象細胞あるいは一つの細胞集団に含まれる異なるDNA配列のコピー数のもう一つの細胞あるいはもう一つの細胞集団に含まれる実質的に同一のコピー数に対する比を測定する方法にも関連している。この方法は上記に記載された工程(a)～工程(f)と、次の工程(g)及び(h)からなる。すなわち、

g. 両方の対象細胞あるいは対象細胞集団にある目盛り配列(calibration sequence)の平均コピー数を測定する工程であって、前記目盛り配列が実質的に参照となる中期細胞にある単一のコピー配列に固定される工程、及び

h. 前記目盛りの位置での比のプロファイルが前記(g)工程で決定された平均コピー数の比に等しくなるように、それによって前記参照となる中期染色体に於いた他の位置で標準化された比のプロファイルがその位置で結合するであろう二つの対象DNAにあるDNA配列のコピー数の比を呈するように、(f)工程で算出された

対象細胞あるいは対象細胞集団の一つがテスト細胞あるいはテスト細胞集団であってこれに対しその他の対象細胞ないしその他の対象細胞集団が標準細胞ないし標準細胞集団であり、この標準細胞ないし標準細胞集団における前記参照となる中期染色体の異なる位置に結合するDNA配列のコピー数が周知であって、さらに次の工程(i)～工程(h)からなる。即ち、

i. 前記参照となる中期染色体に於いた位置を示す関数として前記結合されたそれぞれの対象DNAから発生するシグナルの強度を測定しかつその強度の比を算出することにより比のプロファイルを得る工程と、

g. それぞれの位置に結合している標準細胞あるいは標準細胞集団にあるDNA配列の周知のコピー数に比のプロファイルをかけ算することによって前記参照となる中期染色体に於いてそれぞれの位置での比のプロファイルを調整する工程と、

h. 前記参照となる中期染色体に於いて異なる位置で前記調整された比のプロファイルを比較する工程であって、ある位置における調整された比のプロファイルが大きくなるほどそこに結合しているテスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれているDNA配列のコピー数が大きくなることを特徴とする比較工程である。

本発明のもう一つの代表的な方法は、テスト細胞あるいはテスト細胞集団に存在する異なるDNA配列のコピーステップの比を決定するための方法であって、この方法にはすぐ上に記述した方法における工程(a)～工程(f)が適用されるとともに、同方法ではそれぞれの位置に結合している周知の配列のコピー数に比のプロファイルをかけ算することによって前記参照となる中期染色体に於いてそれぞれの位置での比のプロファイルを調整する工程と、そして前

比のプロファイルを標準化する工程である。この方法は、更に多くの対象細胞配列にも応用することができる。それは例えば二つ以上の対象DNAに存在するDNA配列のコピー数の比を測定する場合であって、この際における比較は、それぞれの対象DNAから得られるシグナルの間でペアワイズを行なうことによりなされる。

さらにここでは、テスト細胞あるいはテスト細胞集団中の異なるDNA配列のコピー数を比較する方法が記載されており、その方法は、上記に記載した工程(a)～工程(e)が適用されるとともに、次の工程(f)及び(g)からなる。即ち、

f. それぞれの対象DNA配列から発生するシグナルの強度、即ちその相対強度を、参照となる中期染色体に於いた位置を示す関数として観測したり測定したりする工程であって、そこでは対象細胞あるいは対象細胞集団の一つがテスト細胞あるいはテスト細胞集団であって、これに対し他の対象細胞あるいは他の対象細胞集団が正常細胞あるいは正常細胞集団であるような工程と、

g. 前記参照となる中期染色体に於いて異なる位置間の相対強度を比較する工程であって、そこではある位置における相対強度が大きいほどその位置に結合する前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれる配列のコピー数が大きくなることを特徴とし、ただしこの特徴は性染色体には当てはまらず、性染色体における前記の比較は、正常の対象細胞あるいは正常の対象細胞集団にある常染色体にある配列のコピー数に対する性染色体にある配列のコピー数の既知の差を計測することを必要とするものであるような工程である。

関連する代表的な方法は、テスト細胞あるいはテスト細胞集団に存在する異なるDNA配列のコピー数を比較するための方法であって、その方法は前述の工程(a)～(e)が適用され、そこでは対

象参照となる中期染色体上のある一つの位置に結合する前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれるDNA配列のコピー数の、もう一つの位置に結合する配列のコピー数に対する比を、第1の配列の位置に調整された比のプロファイルを前記第2の配列の位置に調整された比のプロファイルで割ることによって算出する工程が含まれる。前記代表的な方法は、テスト細胞あるいはテスト細胞集団に存在する異なるDNA配列のコピー数を決定する目的でも用いることができる。この場合には上述した工程(a)～(f)が行われ、それらに続いてそれぞれの位置に結合している標準細胞あるいは標準細胞集団にある周知のDNA配列のコピー数に比のプロファイルをかけ算することによって前記対象となる中期染色体に於いてそれぞれの位置での比のプロファイルを調整する工程と、

前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団に含まれ、参照となる中期細胞にある単一のコピー配列に実質的に固定される目盛り配列のコピー数を測定する工程と、

前記参照となる中期染色体にある目盛り配列の位置での標準化されかつ調整された比のプロファイルが上述の工程で測定された目盛り配列のコピー数と等しくなるように、更にもう一つの位置での標準化されかつ調整された比のプロファイルの値が前記テスト細胞あるいはテスト細胞集団においてその位置に結合するDNA配列のコピー数に等しくなるように調整された比のプロファイルを標準化する工程とが行われる。

この方法は実形してアナログ法として行うこともでき、その場合には二つあるいはそれ以上の目盛り配列が用いられ、そして調整された比のプロファイルが目盛り配列の全体のコピー数に最適に適合するように標準化される。好ましくは、その目盛り配列のコピー数

は *in situ* ハイブリダイゼーションによって決定される。これらの方法は、一つ以上の目盛りの位置に対するプローブを *in situ* ハイブリダイゼーションする工程と、その目盛りの位置に比のプロファイルを最適に適合させることができるように増幅化する工程から構成することが可能である。標準細胞あるいは標準細胞集団は、正常遺伝子であることが好ましい。CGHについての多くの応用例では、参照となる中期染色体は正常染色体である。

更に、この発明はアンテナ細胞ラインに対して行われる。具体的な方法では対象細胞あるいは対象細胞集団に存在するなんらかの配列または一群の配列の増幅度を測定するための方法であって、この場合には、上述の方法の工程 (a) ~ 工程 (e) を本質的に備えており、*in situ* ハイブリダイゼーションがアンテナ細胞に対して行われる。そのアンテナ細胞ではDNA配列あるいは配列群がテストされるように増幅されている。そしてその方法には、他の領域よりも意味あるほどに強い強度でハイブリダイゼーションが行われる領域について前記対象細胞を調査する工程が含まれ、そこではそのような領域が存在することでテストが行われている配列あるいは配列群の増幅度が示される。前記アンテナ細胞ラインの染色体は前期のものを用いても中期のものを用いてもよい。

単一のラベルされた対象核酸をハイブリダイゼーションする場合、あるいは多数でラベルされた対象核酸が連続的にハイブリダイゼーションが行われた場合、前記参照となるゲノムの上に存在する結合部位が、単一のシグナル強度あるいは複数のシグナル強度を識別ないし測定するまえには緩和されないようにすることが重要である。単一のラベルされた対象核酸の場合では、非飽和は多くの手法を用いることで達成される。例えばハイブリダイゼーションを停止し

たり、不十分量の核酸を用いたり、またあるいは充分量のラベルされていない核酸を提供したりすることによって非飽和状態を形成できる。このラベルされていない核酸は、前記参照となる染色体にうまく相補的に結合して、ラベルされた対象核酸によって結合部位が飽和されるのを競争的に防ぐことができる。

二つあるいはそれ以上のラベルされた対象核酸がある場合、これらの対象核酸は連続的にあるいは同時に前記参照となるゲノムに対して *in situ* でハイブリダイゼーションが行われる。同時の *in situ* ハイブリダイゼーションが好ましいが、それは、参照となるゲノムに存在する相補となる結合部位の飽和がその同時のハイブリダイゼーション手法を用いることで防げられないからである。連続的な *in situ* ハイブリダイゼーションが用いられた場合、個々のハイブリダイゼーションが参照となる染色体における結合部位が飽和されるまえにうまく停止されるような条件の下で行わなくてはならない。

本発明の目的はゲノム内の配列コピー数の不安定性を1回のハイブリダイゼーションで検出し、ゲノム中の配列の獲得や損失をマッピングし、またあるいは対象となるゲノムのコピー数変化を示すことである。

さらに本発明の目的はいくつかの異なる細胞や細胞集団に共通した相対コピー数の相違を検出することである。例えば、CGH法はいくつかの異なる腫瘍から得たDNAを混合しラベルしたものをを用いて行うことができる。これらの混合しラベルしたDNAを正常な細胞染色体にハイブリダイゼーションさせることでほとんどの腫瘍におけるコピー数の変化のみを迅速に同定することができ、低頻度で起こる変化は除外される。このように本発明は異なる細胞または

あるいは異なる細胞集団からなるいくつかの細胞から抽出した2種類あるいはそれ以上の対象となる核酸を同じようにラベルして反復配列を除去したあるいは抑制した条件でまた前述の混合してラベルした核酸配列に共通な配列コピー数の違いが分かっている条件で参照染色体にハイブリダイゼーションさせるというCGH法の利用を提示する。

本発明の別の目的は公的に記録された染色体材料、すなわち生じた超微細本でなるべくなる組織を採取した患者の医学記録にカテゴリー化検索できるようにしたもの、あるいは考古学的な染色体材料についての細胞遺伝学的解析の手助けを提供することにある。このような染色体材料は増殖し染色体標本を調製する生細胞が得られないため通常伝統的方法では検定を調べることができない。しかし *polymerase chain reaction (PCR)* 法あるいはそれ以外の方法によりこれらの材料から核酸を抽出し増幅し、本発明により検査することができる。

本発明は腫瘍内で増幅や欠損が選定したものを同時に検出する方法で、その結果は腫瘍のその後の振舞いを決定するのに利用できる。前述の決定は腫瘍細胞の無異性と増幅や欠損のパターンとを関連させることにより行う。この関連づけは、例えば前述のように医学記録で検索できるようにした公式の腫瘍組織から得たDNAをテストしたときや新鮮な腫瘍標本をCGH法によりテストしたときに行われ、腫瘍のその後の振舞いを観察していく。さらに、このようなCGH法による関連づけは複数の対象細胞や対象細胞集団、例えば1つあるいは複数の腫瘍に同じで行うことができる。

この発明の別の目的は、癌発症初期段階の病変と思われる部位の細胞を解析する方法を提示することである。この方法の利点

ごく少量の細胞でも解析ができることである。病変部位の細胞の増幅や欠損を早期に検出することで、例えばこのような遺伝子再配列に関係があることが知られている侵襲性腫瘍で早期に治療を施すことができる。さらにこのような早期の検出により細胞の進行状況と本方法で検出される遺伝子再配列とを関連させて考えることができる。

腫瘍はそこに含まれる細胞が異なるタイプの遺伝子再配列を起こして多くの集団から成ることでヘテロな様型となりうる。前述したように腫瘍細胞は増殖が困難で、培養細胞が最初の腫瘍細胞集団の特徴を示しているかどうかは明らかではない。本発明は増殖の難点を回避して腫瘍細胞の遺伝的な特徴づけを可能とし、また本発明の方法で腫瘍内の異なる部分領域の細胞をテストすることによって腫瘍の異質性遺伝的な特徴づけを可能とした。また多くの腫瘍細胞から大量に核酸を抽出することで腫瘍内の安定した増幅や欠損をテストすることも可能である。

検出感度を向上するためにアンテナ細胞系と名付けたある細胞系を用い、核酸の増幅や欠損を検出する方法も本発明の別の目的として提示する。

本発明のさらなる目的として、子供の細胞から核酸を抽出して本発明に従って解析することで出生前および周産期の解析をおこなう方法を提示する。ヒトDNAを正常なヒト中期染色体にハイブリダイゼーションさせ、例えば第21染色体が余分に存在するダウン症候群などのように欠損や増幅がないかどうかを検査することがCGH法の1つの具体例として挙げられる。CGH法を行うためのテストキットも提示した。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明すなわち、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) のいくつかの方法を遂行するのに使われる一般的な方法を模式的に示したものである。参照となる染色体は、求める情報を得るためにいろいろな標識混合物を用いてハイブリダイゼーションされる。代表的な混合物では、他のさまざまな核酸集団中のブロック配列、例えばヒトゲノムDNA中の高頻度反復配列をブロッキングするように設計されたラベルしていない配列を含むことができる。すなわち、たとえば、ヒトのゲノムDNA内にある高頻度反復配列や、ラベルされた対象核酸のために用いられる濃度が10倍程度のファクター内に存在しているヒトゲノムDNAのようなラベルされた混合物に対するターゲット部位の飽和を防ぐためのラベルされない競争者核酸 (第4図参照)、また、例えば腫瘍と正常ゲノムDNAなどの結合状態を互いに区別することが可能で、異なる起源から得られて異なるラベルが施された、一個あるいはそれ以上のプール (第5図と第6図参照) などを含むことができる。ラベルされたプールの配列頻度に関する情報は、参照となる染色体に沿った位置の周知としてのシグナルにおける個々のシグナルの強度および/もしくは強度比における差異を解析することによって得られる。

第2図には、以下の例1において使われるCGH操作の一般的な概略図が示されている。参照となる染色体スプレッドは、この例では正常ヒト染色体であるが、まず最初に約1時間高濃度のラベルされていないヒトゲノムDNA (第2A図) とプレハイブリダイゼーションされる。プレハイブリダイゼーションにより、染色体におけるおおくの高頻度反復配列がブロックされて、ラベルされた対象核酸、この場合はラベルされた腫瘍DNAに存在する高頻度反復配列

は、引き続くハイブリダイゼーションによって実質的なシグナルとしては現れなくなる。ラベルされた腫瘍DNAをしておそらくそれと結合するDNAもしくは他の対照核酸はその後、参照となる染色体にハイブリダイゼーションされる (第2B図)。以下の例1のように、ラベルされた対照核酸内に存在するセントロメアの反復配列をさらに効果的にブロッキングする目的で、ハイブリダイゼーションの際にCot-1 DNAが用いられる。

第2図は、反復配列からのシグナルを減らす一つの方法の代表例である。他の方法は以下に詳しく述べられる。図の残りの部分に概略されている方法を含むCGH法のそれぞれにおいて、反復配列からのシグナルを低減するいくつかの方法が用いられているが、図では特に示されていない。CGH法にとって重要なことは、それぞれの対象核酸からのシグナルが、十分に区画された遺伝子座に結合する配列によって顕著であることである。ゲノム反復からのシグナルを完全に抑制することは必要ではないが、抑制が目くればなるほど、本方法は配列頻度における少しの差異を検出することが困難になる。

第3図は、さらに例1において使われる操作を示したものである。第3A図に示されるように、ラベルされたヒト腫瘍DNAは、正常のヒト染色体スプレッドにハイブリダイゼーションされる。(第2図に対する説明において示されているように、反復配列からのシグナルを抑制することが前提であったが、この前提は図において特に示されていない。例1では、反復配列からのハイブリダイゼーションシグナルを抑制する一つの方法が詳しく説明されている。) この代表的な例において、腫瘍DNAはいくつかの配列が強く増幅されるような、たとえば、癌遺伝子を含むアンプリコンの

ような領域を持っていると仮定されている。この腫瘍DNAにおいて増幅される配列は、ある腫瘍染色体においてはクラスター化され統合される。また増幅配列は腫瘍ゲノムにおいて複数の場所へ統合される。もしくは、増幅配列は余分な染色体要素として存在し得るわけである。アンプリコンの配列は、参照となるゲノム、この場合は正常ヒトゲノムであるが、そのような参照となるゲノムにおけるある染色体の座位にマッピングされるだろう。

第3B図は、ターゲットである参照となる染色体上へシグナルを構築する反応動力学 (キネティクス) を図示している。シグナルは増幅される領域においてより迅速に形成される。なぜならこれらの配列のより多くのコピーがハイブリダイゼーションに提供されるからである。もし、反応がターゲット染色体が飽和する前に停止した、あるいは十分に、不十分な量の腫瘍DNAが飽和を完了するために加えられたとしたら、そのときは、腫瘍において増幅されたゲノム領域は正常染色体上でより強く現れるだろう。この様子は、左の参照となる染色体上でより強く斜線で示したバンドによって示される。もっと強くラベルされた領域 (より強く斜線を施したバンド) は、対照ゲノムにおいて反映されるようにアンプリコンの位置と量を示している。このように、増幅は前もって存在するかどうかを知らなくても検出され、そして増幅された配列の原は正常ヒトゲノムにマップされる。

もし、第3図に示すような反応がターゲット部位が飽和するまで進行することができたとすると、コントラストが失われてしまう。このことは右の代表的な参照となる染色体によって示されるように、アンプリコンが識別されなくなるのである。したがって、CGHをこのように実施するときには、ターゲットの飽和が起こる前にハイ

ブリダイゼーションを停止すること、もしくは飽和するには不十分な量のプローブしか供給しないことが重要である。グラフには、増幅された領域 (グラフ右) と増幅されない領域 (グラフ左) におけるハイブリダイゼーションシグナルの形成が模式的に示されている。矢印は、化学動力学曲線の経過時間と染色体領域とを結んでいる。

第4図には、第3B図の右部分に示されるようにターゲットの増大的な飽和を避けるCGHの実施例が示されている。この代表的な例において、参照となる核酸はヒト染色体であり、対象となる核酸はラベルされた腫瘍DNA (4A) である。もし、ラベルされていないヒトゲノムDNAがラベルされた腫瘍DNAとともに過剰に、この場合は腫瘍DNAの濃度よりも5倍高い濃度であるが、含まれるならば、このときターゲットのどんな飽和も、第3B図の右部分に示すようにラベルされたコピー同士だけというよりはむしろ、核酸配列のラベルされたコピーとラベルされていないコピーの結合に基づく。(ここでも第2図および第3図において示したように、反復配列からのシグナルを低減する方法は、この図には示されていない。しかし参照となるゲノムに存在する多量遺伝子座に結合する反復配列を実質的に取り除くため、かつ/もしくはそのような配列がターゲットと結合することを阻害するような反復配列を十分に除くためにプロトコルが行われるものと仮定されている。)

反応の初期段階では、増幅される領域は、染色体の他の領域よりもより速く形成され (たとえば、もし配列が5倍に増幅されたらとすると、5倍より速く形成される)、第3B図の左に示すように増幅領域は検出可能になる。しかしながら、反応が飽和へ進行するにつれて、染色体の増幅されない領域が第3B図の右に示されるよう

に5分の1(1/5)だけの強度にしか達しない。これはほとんどの部位はラベルされていない配列のコピーで満たされているからである。一方、腫瘍において5倍に増幅された一つの配列は、増幅強度の半分(1/2)に達するであろう。というのはこの配列のラベルされたコピーとラベルされていないコピーとは同じ数存在するからである。このように、コントラストは反応の進行にともなって変化されるけれども、コントラストは、本法によれば反応のすべての段階で維持される(第4B図に示されるように)。

第5図には、いろいろな配列のコピー数の少しの変化を検出する感度を高めるために考案されたCGHの実行方法が図示されている。第4図に示されたCGH操作に従うと、増幅レベルの固有の変化、すなわち、参照となるゲノムの異なる位置で形成されるシグナルの強度は、配列の異なる増幅もしくは損失を示しているのではないだろう。このような固有の変化は、配列のコピー数の変化を示しているという強度量の解釈と相入れないだろう。このCGHの実施例はそのような潜在的な問題を克服している。ラベルした対照となる核酸。この場合は緑色の蛍光色素でラベルされた腫瘍DNAを用いているが、このラベルした対象となる核酸の混合液と、別にラベルされた競争者核酸。この場合は赤色の蛍光色素でラベルされた正常ヒトゲノムDNAが用いられていて、この両者を供給することによって、この2つの別々にラベルされたDNAは、染色体に同時にハイブリダイゼーションされる。(もう一度言うが、反復配列を除去および/またはそれらのシグナルをブロックすることは実行されているが、ただし図示されていない) 参照となる染色体のそれぞれの染色体に沿っての緑色対赤色の比の変化は、それゆえ腫瘍における配列コピー数の増加もしくは減少する領域を示す。これら

の比の変化は、参照となる染色体上での赤から黄へ緑へという色の変化を結果として引き起こす。

第6図は、グラフにかつ模式的に第5図に図示したCGH法のもとになる反応動力学を説明している。中心には、参照となる染色体のうちの1つの染色体。この場合は正常ヒト染色体がある。対照染色体上の斜線の傾きは、染色体に沿っての緑色と赤色強度の比を示している。

増幅される領域では、緑色/赤色の比は正常領域における値よりもずっと高い。一方欠損領域では、緑色/赤色の比は正常領域におけるよりもずっと小さい。緑色/赤色強度比の異なる領域のそれぞれの具体例からの矢印は、ハイブリダイゼーション中における緑色(腫瘍DNAでの実験)と赤色(正常DNAでの実験)シグナルの形成を示す反応動力学率曲線を描き示す。正常領域では、グラフの上端であるが、赤色と緑色のシグナルは共に形成される。(シグナルは、本説明のために等しくなるように規格化してある。) 増幅される領域では、上部右側であるが、緑色(腫瘍)シグナルが赤色(正常)シグナルよりもきわめて迅速に形成される。緑色/赤色比は近似的に増幅のレベルになる(染色体の正常部分に規格化したと仮定して)。

第6図の左下側に、重複領域のシグナル形成が示されている。つまり、緑色(腫瘍)シグナルは、赤色(正常)シグナルより50%より明るくなっている。右側には、欠損領域のシグナル形成が模式的に記述されている。つまり、緑色(腫瘍)シグナルは、赤色(正常)シグナルより50%暗くなっている。このCGH実施例の比をとる方法は、いくつかの染色体スプレッドへのハイブリダイゼーションが局所的なハイブリダイゼーション環境の相違によって結

よりも本質的により明るくなっていることを常に発見すること、さらに標準化する。

第7図は、5つの腫瘍細胞系におけるX染色体の数と、常染色体の緑色-赤色比に相対化したX染色体の平均緑色-赤色比との相関をグラフィカルに示している。

第8図は、乳癌細胞系800PE(緑色)もしくは正常DNA(赤色)との比較ゲノムハイブリダイゼーションをした場合の、第1、9、11、18、及び17染色体の緑色-赤色比のプロファイルを示している。このプロファイルは、染色体領域の相対的なコピー数を反映している。18pと16qというコスミドプローブと中期や前期にある800PE細胞との蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH)は、次のことを示した。すなわち、16pコスミドプローブでは2つのシグナルがあり16qコスミドプローブでは1つのシグナルがあった。FISHによって提供されるこれらの遺伝子座の絶対的コピー数に関するこの情報は、比の値1.0の解釈として、ゲノム全体でその配列の2つのコピーが存在することを示しているといえる。

1p38から1p34におけるプロファイルの隆起は、以前に認められなかった小さい間在的な欠損を示しているのかも知れない。しかしながら、この領域は、その領域にたいする特異的なプローブを用いて独立にはまだ証明されていない。ゲノムのセントロアおよびヘテロクロマチン領域は、解析には含まれない。というのはCoier DNAがこの領域のシグナルを部分的にブロックしたり、またはそれらの位置で同一の配列間に生じる大きなコピー数多型が信頼できない比データを生じさせたりするからである。

第9A図と第9B図は、COLO 820 HSR(ヒト大腸癌

細胞系)とNCI H69(小細胞肺癌細胞系)のDNA(緑色)をそれぞれ正常ヒトDNA(赤色)と比較ゲノムハイブリダイゼーションした時における、第8染色体(第9A図)と第2染色体(第9B図)の緑-赤強度比プロファイルを示している。

第9A図は、8q24のmyc遺伝子座の緑-赤比が、大きくなっていることを示している。これはよく知られたCOLO 820 HSR細胞系のmyc遺伝子座の高レベルの増幅と一致する。

第9B図において、3つの増幅された領域が第2染色体の上に見られる。2p24でのシグナルは、NCI-H69細胞系において増幅されることが知られているN-myc遺伝子座に対応する。高い緑-赤強度比を示す他の2つの領域、2p21と2q21が、NCI-H69細胞系で増幅されるということはこれまでに知られていなかった。

図 解 説 明

比較ゲノムハイブリダイゼーション(CG H)は、またコピーレシオリバースサイトジェネティクス(CRR C)、競争ハイブリダイゼーションそして定量的in situレシオリバースサイトビギング(QUI RK)とも呼ばれている。さらに、蛍光染色をラベルとして用いた実施例で、本方法は、競争FISH(蛍光in situハイブリダイゼーション)と呼ばれた。CG Hは、一つのゲノムを直ちに既知して、増幅、重複や欠損を同定しうる方法を特に提供する。

CG Hは、核酸配列(たとえば腫瘍から分離されたゲノムDNA)の混合物における異なる要素のコピー数の変動を、参照となる生物のゲノム(たとえば、同じ種由来の正常細胞のゲノム)におけるこの配列の位置の同定として、決定する方法を提供する。これらの方

法は、複製配列混合物を参照となる生物の染色体へ *in situ* ハイブリダイゼーションすること、染色体に沿っての異なる位置におけるハイブリダイゼーションの強度を測定すること、から構成される。例示的な方法が、模式的に第1図から第6図に概略されている。これらの図式例は完全なものではなく、基本的なアプローチの幅広い応用方法や他の使用法を開示するものである。

図の説明が示すように、反復配列からのシグナルが対象複製プールからのシグナルを没しないこと、ならびに反復配列からのシグナルがプールから取り除かれること、もしくはこのシグナルが必要に応じて抑制されることが、重要である。例えば、異なる染色体上にある部位と同一染色体上にあるが全く異なる部位とのかのように、染色体上の全く異なる多くの部位と結合してしまうような配列を、ハイブリダイゼーションから除去するかまたは、ハイブリダイゼーション混合物においてブロックすることが望まれる。CGHの多くの適用において、ラベルされた対象複製から除かれたり、ブロックされたり、結合相手がブロックされるのは、とりわけ *A1u*, *Kpn*, *Lin* とアルファサテライトのような高頻度反復配列である。ここに記述するのは、このような反復シグナルを除去したり、ブロックする方法である。標的複製において単一コピー位置に結合する複製配列は、ラベルされた対象複製のハイブリダイゼーション混合物中に十分に保持されていることに注意を払うべきである。そしてハイブリダイゼーションの前や途中で、多重に遺伝子座位（すなわち、複合的に区別し得る遺伝子座）に結合する反復配列に較べると、そのような単一コピー配列は、参照となる染色体における結合部位と同じように、十分にブロックされずに残ることに注意を払うべきである。

以下の例1, 2, 3のCGHに関連した代表例は、腫瘍細胞系DNAの正常ヒト中期染色体へのハイブリダイゼーションを含む。しかしながら、異なるゲノム由来の異なる複製の度で行う、二対ごとや多重のハイブリダイゼーションには多くの類似組み合わせがある。これらはすべて本発明の範囲内で考慮されている。

たとえば、CGHは、腫瘍細胞系由来のラベルされたDNAを同じ細胞系の中期染色体とハイブリダイゼーションするのに使い得るだろう。こうして、それぞれの細胞系における増幅のレベルとパターンを、これらの結果を同様の腫瘍細胞系DNAの正常ヒト中期染色体へのハイブリダイゼーションと比較しながら、評価できる。交互的に、健康腫瘍細胞系DNAと、別ラベルされたヒトゲノムDNAは、同時に腫瘍細胞系の中期染色体にハイブリダイゼーションすることができよう。さらに、原発性腫瘍由来のDNAと、その転移由来のDNAは、別ラベルされCGH法では、正常ヒト中期染色体もしくは関連した腫瘍細胞系中期染色体にハイブリダイゼーションできよう。これらは、CGHの多くの例のほんのいくつかにすぎない。

ここでの例は、乳癌細胞系および原発性腫瘍由来のDNAの正常ヒト中期染色体へのハイブリダイゼーションに関連したことであるけれども、当業者なら誰でも以下のことが明らかであろう。すなわち、CGHは、腫瘍細胞のゲノムの研究、もしくは異常なゲノムを正常なゲノムにハイブリダイゼーションするという結果に限定されたものではない。CGHは、任意の2つもしくはそれ以上のゲノム、もしその複製配列が十分に相補的で意味のある解釈ができるならば異なる生物種のゲノムでさえも、の複製配列コピー頻度の比較を可能にする。生物種間の比較に関して、CGHによって得られた情報は、

本発明の方法は、以前には知られていなかった増幅と欠損領域を特定する具体的方法を提供する。たとえば、例1で詳しく述べられているようにCGHの1つの実施例は、少なくとも大きな欠損領域に約5倍から10倍以上大きく増幅されたすべての領域を特定することによって、ゲノムの異常を直ちに与える効率のよい方法を提供する。より小さな増幅と欠損を特定することができるさらに感度のよい具体例も、また開示されている。

ナノグラム量の対象複製が、本発明のCGH法には必要である。パラフィン包埋腫瘍切片は、新鮮なもしくは凍結材料と両様に使うことができる。正常および悪性組織からのsnap凍結材料が、mRNA分離には適している。

対象細胞からの必要な複製を分離するためには、標準的な処方が用いられる。しかしながら、もしDNAとかmRNAのような複製が、少ない数の細胞（特定の腫瘍の一部のように）から、もしくは単一細胞から抽出されるのであれば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法とか、非ポリメラーゼ連鎖反応（non-PCR）法によって、その複製を増幅することが必要である。PCRおよび望ましいPCR配方は他に述べられる。例示的なnon-PCR配方は、リガーゼ連鎖反応（LCR）と、適当なプライマーとその拡張（ランダムプライミング）を使う事による線形の増幅反応を含んでいる。

CGHの様々な実施例のいくつかは、特に第1図から第6図において、図解されている。第5図および第6図において示される実施例では、対象複製が、この場合はヒトゲノムDNAであるが、他の対象複製から別ラベルされ、増幅や欠損がシグナル強度の単なる変化というよりはむしろ、異なるシグナル間の比の変化によって示される。

相対的なコピー数を評価するだけでなく、配列の多様性の評価をも含んでいることを注目すべきである。

対象細胞中の遺伝子の位置及び発現レベルを決定するために、染色体DNAではなく対象細胞中のメッセンジャーRNA（mRNA）や相補的DNA（cDNA）などを用いてハイブリダイゼーションを行うことができることが当業者には明らかであろう。細胞や組織集団からのmRNAの抽出、逆転写による *in vitro* のcDNA合成は通常の方法で行われた。

CGHは対象ゲノムの高頻度染色体、例えば中期、前期もしくは他の凝縮した状態の染色体の調製を必要としない。このように、中期、前期など凝縮した染色体を調製するのが困難、時間がかかる、あるいは不可能であるゲノム、たとえば腫瘍細胞や胎児細胞のゲノムもCGHによって研究することが可能である。

CGHは、ラベルした腫瘍複製が増幅、重複、または欠損した複製配列上で発するシグナルをコントラストよく可視化できる条件で、対象DNAたとえばラベルした腫瘍DNAと参照ゲノム例えば正常ヒト中期染色体のハイブリダイゼーションをおこなう。

このような可視化は、高頻度で存在あるいはクラスター化した *A1u*, *Kpn*, *Lin* と、アルファサテライトあるいはその他の反復配列を含む多くの遺伝子座へ結合する反復配列のハイブリダイゼーションを、ラベルしていない全ヒトゲノム複製であればDNAまたはゲノムDNAのうちで反復配列を多く含む部分（*Co1*）を使って抑制する、またはあるいはハイブリダイゼーション混合物からそのような反復配列を除去することによっておこなう。要求される検出感度に関しては、調べられるコピー数の差異を十分検出できるコントラストを得るのに必要な強度に応じて反復配列の

除去やそれらのハイブリダイゼーションの抑制の程度を調整することができる。例えば、コピー数の変化が少なければそれだけより低いレベルの反復配列を抑制したり除去したりしなければならない。

複数のラベルした核酸をハイブリダイゼーション混合液中で用いる際には、それらの相対濃度や濃度密度はいろいろな目的によって変更される。たとえば結果を視覚的に観察するまたは写真撮影する場合、個々の色強度はそれぞれの相対的な強度の違いが最もよく分かるように調整する必要がある。このような調整は、さまざまな選択枝のうちで、適当な検出試薬（アビジン、抗体など）の選択や顕微鏡フィルターのデザインによって行うこともできる。定量的な画像解析をおこなう時は、異なる色で染色したときの一般的な強度差を数学的に標準化して補正することができる。

CGHにおけるハイブリダイゼーションの動力学は複雑である。対象核酸はしばしば二本鎖であるため、相補的な配列は染色体にハイブリダイゼーションすると同時にハイブリダイゼーション混合中でも再会合する。そのような再会合のために、高頻度反復配列の濃度は低頻度のそれに比べてより急速に低下し、そのため対象DNA中のコピー数の違いが参照染色体上では本来よりも小さなシグナル強度の差となって現れる。さらに、ラベルした対象DNAはスライドガラスやカバーガラスなどに非特異的に結合するため、これらDNAの濃度はハイブリダイゼーション中に順じて低下する。当業者は、CGHの定量化を最適化する多くの方法、例えばデジタル画像を数学的に修正する、ハイブリダイゼーション中に変性度の対象DNAを加える、再会合速度を抑えるほど大量のラベルしていないゲノムDNAを加えるなどの方法があることに気づくだろう。〈熟知〉という語はハイブリダイゼーションの動力学を背景にして定義

されている。

伝統的な細胞遺伝染色の場合と同様に、CGHの解像力は真在のところ光学顕微鏡で見ることのできるレベルである。したがって対象核酸中の小さい配列を増幅して対象ゲノム中のシグナルとして観察するためには、配列を増幅する段階はそのシグナルが光学顕微鏡下で見える程度に十分でなくてはならない。たとえば例1におけるCGHの実施例を引合いに出すと、比較的小さな θ 13-2 遺伝子座（非常におおまかには、数百kb）は光学顕微鏡で可視的に区別されるためには少なくとも倍より多く増幅されなければならない。一方染色体中の大きな部分が対象核酸中に高頻度で存在する場合は、その部分のシグナルは参照ゲノム中においてもっと低い増幅レベルで見えるようになる。

〈ラベルした〉という語は、ここでは核酸断片が断片成分を直接持っているかどうかに関わらず、対象に結合した核酸断片を可視化するなんらかの方法があるということを示している。〈対象核酸の核酸断片のラベル〉と題した項では、プローブを直接ラベルするいろいろな方法と、結合したプローブを検出他のラベル法について述べた。

〈アンテナ細胞系〉という語は、ここでは1つまたは複数の既知の重要な遺伝的異常がある参照ゲノムを示す。例としては、高度に増幅された癌遺伝子を例えば大きな均質染色領域（HSR）に持つことが知られている細胞系である。このような細胞系の増幅領域は、正常な染色体に比べてはるかに大きな対象部位を持つといえる。増幅された対象配列は平均してより明るいシグナルを発するであろうことから、このようなアンテナ細胞系から得た参照ゲノム中のこれら大きな対象部位のシグナルはより容易に観察される。たとえば

多くの腫瘍細胞から抽出した対象核酸をCGH法によりアンテナ細胞系へハイブリダイゼーションさせることで、この細胞系で増幅している事が知られている癌遺伝子が、同様に対象核酸中で増幅されているかどうかをテストすることができる。

アンテナ細胞系を参照ゲノムとして用いる時は、参照染色体はむしろ間接を用いる方がよい場合がある。たとえば対象核酸中である癌遺伝子が増幅されているかどうかを調べる場合、前期CGHは前期染色体を用いたCGHで十分である。しかしながら、情報は前期染色体を用いた時に最も多く得られる。

ゲノムのあらゆる位置の塩基配列は、〈単一コピー〉もしくは〈反復〉のどちらかに分類される。実際の目的を考えると、ハイブリダイゼーションの条件下で相補的なプローブが対象となる配列と安定に結合できるほど十分に長くなりなければならない。この長さは典型的には数十から数百ヌクレオチドの範囲である。

〈単一コピー配列〉は、単染色体ゲノム当たりただ1コピーの対象核酸配列が存在することを表す。〈単一コピー配列〉は当分野では〈ユニーク配列〉としても知られている。単一コピー配列に相補的なプローブは単染色体ゲノム当たり1つの結合部位を持つ。〈反復配列〉とは、同一のターゲット核酸の配列がゲノム当たり複数コピー存在することを表す。反復配列のそれぞれのコピーは全く同一である必要はない。重要な特徴は、反復配列のうちの配列が他の配列と十分似ており、使われるプローブ核酸の同じ断片がハイブリダイゼーションの条件下でどのコピーとも安定に結合できるということである。

ここでは、反復配列、反復した配列、反復はそれぞれ同じ意味で使われている。

〈中期染色体〉という語は、ここでは〈凝縮染色体〉の概念を含むように定義され、そして有糸分裂の前期および中期の凝縮した染色体だけでなくすべての凝縮染色体、たとえば未成熟な染色体標本や個々の染色体が識別される細胞周期のあらゆる段階における染色体を意味するものと定義されている。参照ゲノムの染色体は個々に識別できるほど十分に凝縮していることが望まれる。

対象核酸はここでは、もしそれが同じ量の両性の類のもの由来でかつ他の核酸と比べて細胞遺伝学的に大きく変わらない場合は、他の核酸と同じとみなしている。例えば本発明の目的では、正常なヒト女子リンパ球から抽出したDNAは正常なヒト女子胎盤細胞から抽出したDNAと同じ核酸とみなされる。

ここでは以下の省略形が使われている

省略形

AAFP	N-アセトキシル-N-2-アセチル-アミノフルoren
ATCC	アメリカンタイプカルチャーコレクション
BN	NP-40を含む重炭酸緩衝液
Brd/Urd	ブロモデオキシウリジン
BRIL	ベセスダ研究所
b.p	塩基対
CCD	電荷カップル装置
CGH	比較ゲノムハイブリダイゼーション
Chf.	染色体の
CML	慢性骨髄性白血病
CRR C	コピー比逆転写産物

DAPI	4, 6-ジアミノ-2-フェニールインドール
dATP	デオキシアデノシン三リン酸
DCS	蛍光アビジンDCSとして使用(蛍光アビジンDを用いる市販されているセルソーター)
dCTP	デオキシシトシン三リン酸
dGTP	デオキシグアノシン三リン酸
DI	DNAインデックス
DM	二重体染色体
dNTP	デオキシヌクレオチド三リン酸
dTTP	デオキシチミジン三リン酸
dUTP	デオキシウリジン三リン酸
EDTA	エチレンジアミンテトラアセテート
E/P	エストロゲン/プロゲステロン
FISH	蛍光in situ ハイブリダイゼーション
FACS	蛍光励起型セルソーティング
FITC	フルオロセインイソチオシアネート
HPLC	高速液体クロマトグラフィ
HSR	均質染色領域
ISCN	国際細胞遺伝学命名法
JB	分岐緩衝液
Kb	キロベース
kDa	キロダルトン
LCR	リガーゼ連鎖反応
LOH	ヘテロ接合性損失
Mb	メガベース
met.	転移

min	分
ml	ミリリットル
mM	ミリモル
mm	ミリメートル
ng	ナノグラム
NIGMS	ナショナルインスティテュート オブ ジェネラルメディカルサイエンス
NP-40	非イオン性界面活性剤 Nonidet P-40 としてSigmaから購入可能(St. Louis, MO)
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PHA	フォームアグルチニン
PI	ヨウ化プロピディウム
PMSF	フェニルメチルスルフォニル フルオリド
PN-buffer	0. 1Mリン酸2水素ナトリウム, 0. 1Mリン酸水素2ナトリウム, pH8, 0. 1%NP-40の混合物
PNM-buffer	PN-bufferに5%非脂肪ドライミルクを加えたもの 0. 1%アジ化ナトリウム
QUIPS	定量的画像解析システム
QUIRX	定量的 in situ 比較型決定法
Rb-1	網膜芽細胞腫抑制遺伝子
RFLP	制限酵素断片長多型
RPM	回転/分 1分間当りの回転数

SD	標準偏差
SDS	Dデシル硫酸ナトリウム
SSC	0. 15M塩化ナトリウム, 0. 015Mクエン酸ナトリウム, pH7
Tc	倍加時間
μ s	マイクログラム
μ l	マイクロリットル
μ m	マイクロメートル
μ M	マイクロモル
VNTR	可変数タンデムリピート

コピー数の相違は、画像解析を用いて複数の細胞染色体への対象領域のハイブリダイゼーションの結果を平均化することでより高精度に知ることができる。このような方法を用いることで、バックグラウンドレベルのシグナル(ノイズ)と検出配列コピー数の違いとを区別する事ができる。

画像解析

結果をより正確に、また、より容易に読み取るために、なるべくコンピュータを用いた画像解析システムが、ハイブリダイゼーションからの信号とバックグラウンド染色の間の強度の差異を拡大または正確に見極めるために用いられてきた。画像解析と強度を測定する方法は、例えば、以下の文献に記載されている。In Hirakawa et al., *Science*, 238: 38-41 (1987) and Alkens et al., *Meth. Cell Biol.*, 29: 293-313 (1989). そのような画像解析システムにおいては、広範囲で比例的な感度を持つ高解度のCCDカメラを用

いることが好まれる。

特別な定量的画像解析システム(QUIPS)の要素は、蛍光励起と検出の視野と言う初期とともに例1にかかれている。例1に例示されているように、フィルターホイールが付属したコンピュータ依存の画像解析システムは、DNAの信号の画像と対比染色からの画像をその画像上で重ね合わせるために用いられた。そこでは、黄色、即ち、正確にスペクトルを反映していない色が表現される。参照拡大、つまり、信号とバックグラウンド染色の強度間の差異が画像解析システムのコントロールによって強調される。増幅付けもまた、そのようなシステムから調査分析された画像内ではほとんど現れないようなものを、バックグラウンド染色の値をゼロにすることで検出できるようにする方法である。よく似ていることだが、コンピュータ解析は、バックグラウンドの計算や信号のぼろぼろの平滑化、正確な強度測定、比例計算、染色体上の信号の平均化を多角的に解析することで可能にする。

絶対コピー数

参照となる染色体に対する対象のDNAハイブリダイゼーションは、配列の相対的なコピー数の情報を提供する。付加的な一般化のいくつかは、絶対コピー数の情報を得るのに必要である。これをするために都合のいい方法の一つは、ブロープ、例えば、通常のハプロイドDNA内のいくつかの単一の遺伝子座や対象とする細胞や細胞群(それぞれ、特定の細胞や代表的な細胞のいくつか)の細胞分裂中期核に特異的なコスミドへのハイブリダイゼーションである。その核を代表する細胞群内でのハイブリダイゼーションシグナルを数えることは、その遺伝子位置での絶対コピー数を与える。一つの

遺伝子座での情報。つまり、参照である既知した染色体への対象とするDNAのハイブリダイゼーションからの強度(比例)情報は、残りのゲノムに対する絶対コピー数を与える。この場合、参照となる遺伝子座への強度(比例)データの最良の適応は、残りのゲノムの絶対コピー数に最も正確な決定となる。

そうして、この発明のCGH法は故意に他によく知られた方法と組み合わせると、参照とするゲノム内でのRNAやDNA配列の遺伝子位置の関数として、対象とする細胞や細胞群の真在する全てのRNAやDNA配列の絶対コピー数についての情報が得られる。例えば、一つやそれ以上の染色体特異性のある反復配列やかなり複雑なベインティングプローブは、対象とする細胞や細胞群のゲノム構成を代表する分裂中期の細胞にそれぞれ別々にハイブリダイゼーションすることができ、染色体ベインティングプローブは、全てのヒトの染色体に用いることができる [Collins et al., *Genomics*, 11: 997-1005 (1991)]。特別な反復配列のプローブもまた、用いられる [Frask et al., *Hum. Genet.*, 78: 351 (1984) and references cited therein; and commercially available from Oncor (Gaithersburg, MD, USA)]。一つ、またはそれ以上のプローブのハイブリダイゼーションは、プローブの結合部位の配列の絶対コピー数を示す。

そのような細胞分裂中期の解析にとっては、およそ35キロベースからおよそ200キロベースからなる複雑なベインティングプローブが好まれる。およそ35キロベースからおよそ100キロベースのプローブの方がより好ましい。更に望ましいのは、コスミドプローブのような、35キロベースから40キロベース程度のプローブである。典型的な遺伝子座特異的ベインティングプローブは、コ

スミド、酵母由来人工染色体(YACs)、細菌由来人工染色体(BACs)、p1ファージプローブなどで、選択的に染色体のアームに結合する。例えば、そのようなコスミドプローブは、全てのヒトの染色体用にコスミドライブラリーを提供しているClontech社 [South San Francisco, CA (USA)] の製品が市販されている。この発明のような方法に用いられるコスミドプローブのもう一つの例は、cC13-787と呼ばれる3pコスミドプローブである。これは、Yusuke Nakamura, M.D., Ph.D. [Division of Bioclonal, Cancer Institute, Toshima, Tokyo, 170, Japan] が開発した。その準備と、3p21, 2-p21, 1へのマッピングは、Yasaka et al., *Genomics*, 9(3): 536-543 (1991) に記載されている。もう一つの例は、Ven-Lin Ivo [Biochemical Department, P.O. Box 5507 (L-452), Lawrence Livermore National Laboratory Livermore, CA 94550 (USA)] が開発したJ14R1A12という3pコスミドプローブである。細胞分裂中期解析にとって、好適な反復配列プローブはセントロメア特異性、またはペリセントロメア特異性のある反復配列プローブである。例えば、そのようなセントロメアプローブには、例1に挙げた以下の2つ、染色体17ペリセントロメア反復プローブ(コスミド c k 17, 10)、染色体8のセントロメア領域に対するαサテライト反復プローブがある。さまざまな反復配列プローブが、Oncor [Gaithersburg, MD, (USA)] から市販されている。しかし、遺伝子座に特異的なベインティングプローブが、この発明の方法において反復配列の絶対コピー数を決定するために反復配列プローブとして好まれる。

更に、対象とする複製配列がDNAである地、参照のコピー数がサテンハイブリダイゼーションによって決定される。

それら参照のコピー数や参照強度は、対象とする細胞や細胞群中の實質的に全てのRNAやDNA配列が決定されることから、基準値を与える。CGH法は、残りの配列の相対的コピー数を決定するために用いられる。しかし、絶対コピー数は、CGHの結果が決定されるのに反して基準値を必要とする。別な方法で、CGH法は、例えばゲノム、半数性、三倍体性、8倍体性の配列の絶対コピー数の差異、またはその中でそれぞれの染色体の1、3、8コピーの存在を見る上でかなり高度に標準化され、また数値化されなくてはならない。

PCRと増強解折

PCRのメカニズムについては、Saiki et al., *Science*, 230: 1350 (1985) and U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,208 (both issued July 10, 1987) and 4,690,159 (issued January 24, 1989) に開明があるので参照された。PCRは、ほんの少量のサンプルを必要とするだけで、そこから急速に足つ、高感度、また広範囲の用途を持つ、細胞フリーな分子クロニングシステムである。

CGH法によってテストするための対象となる複製を増幅するための好適なPCR法は、PCRアダプターリンカー増幅である [Sawders et al., *Exp. Acids Res.*, 17, 9027 (1990); Johnson, *Genomics*, 5: 243 (1990) and PCT 90/08434 (published August 9, 1990)]。ラベルされた対象の複製は、200-300の細胞からアダプターリンカーPCR法によって作成された。例えば、対象の複製が腫瘍DNAであったとき、元のDNAは200-300の腫瘍細胞から得られた。その方法は、腫瘍のCGHクロンナップ細胞群によって解析するである。

もう一つの好適なPCR法は、Meltzer et al. によって記載された「染色体複製解析とその応用による領域特異性プローブの急速な生成: 短染色体複製配列を決定するためのアプローチ」とよばれる、プライマー混合物を用いる方法である [Nature-Genetics, (1): 24-28 (April 1991)]。CGHに関心のあるシグナルを作る、参照となる細胞分裂中期染色体の部位での複製解析は、その部位に結合する複製配列のPCR増幅を可能にする。増幅された複製は、容易に回収し、有用なプローブライブラリーに用いられる。例えば、増幅された配列が急速に鑑定することができるようコスミドライブラリーに用いられる。

コピー反復性配列は、PCRによって対象の複製を増幅することを抑制することができる。その過程で用いられたPCRプライマーは、反復性配列の末端に相補的である。そのようにして、適切な方向に、反復配列によって切り出された配列の増幅が行われる。前述の反復性配列に相補的な配列を最初にハイブリダイズすることによって、そのような一連のPCRの過程で反復性配列の生成を抑制することができる。その反復配列の中で、前述の相補的配列が非相補的に結合する末端を延長したり、ポリエラーゼによる延長を阻止し、ヌクレオチドの延長を抑える。ブロックしている配列の非相補的末端は、その配列がPCRの一連の過程でPCRのプライマーとして働くのを妨げる。反復性DNAファミリーであるA₁UとL₁に反対の方向のプライマーは、散在した反復性配列のPCR (IRS-PCR) [Nelson et al., *PNAS*, 88: 5628 (1991); Ledbetter et al., *Genomics*, 6: 475 (1990)] によってヒトの配列の選択的な増幅を可能にする。

以前から保存された材料

この発明の重要な側面の一つは、保存されていた組織材料からの核酸、例えば、パラフィン包埋ホルマリン固定された病理サンプルは、CGH法によってテストされる。もちろん、前述の核酸を、伝統的な組織学的な化学染色法をされている染色体中に調製することはできない。また、十分に大きい断片をそのような組織切片から、例えばサザンハイブリダイゼーションのような他の従来の方法で取り出すことは困難である。しかし、そのようなサンプルからの核酸は、Greer et al., *Anatomic Pathology*, 93(2): 117-124 (1991) and Duteau et al., *Cancer Res.*, 49: 2364-2369 (1989) のような既知の方法で取り出すことができる。もし必要ならば、さまざまなCGH法で増幅をテストしてもらいたい。その核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法(前述)を用いて増幅される。例えば、前述の Greer et al. の方法により、パラフィン包埋された組織から抽出したDNAをPCRによって増幅できる。

そのように保存されていた核酸をテストする特別な付加価値は、そのようなサンプルが常に患者の医学的な記録として備えられていることにある。それゆえ、診断上及び予後の有意義な情報は、患者の核酸材料の明らかになった細胞遺伝学的な状況と、患者の組織と結果の医学的な経緯の間で作られる。例えば、CGHで集められた情報は、患者の腫瘍の成長と欠損パターンをみることで、結果の知られている過去の患者のパターンと比較することで、腫瘍の侵入性を予測するために用いられるだろう。

よく似たことだが、何らかの方法で固定された、例えば、自然現象の過程を通じて保存された考古学的材料のような他の核酸もまた、CGHによって研究することができる。これまで示してきたように、

腫瘍のコピー数の差異は、既に研究された類似性と分岐の度合についての情報を与える。因生、組織型を問わず、腫瘍の進化学的に重要なつながりや分岐は、CGH法を用いることによって研究できる。

腫瘍細胞遺伝学

CGHは、遺伝子の増幅や欠損、腫瘍の進化の度合の間の関連を評価する手段である。増幅と欠損、癌の段階と個別との関係は、予決的に重要である。なぜならば、そのような情報は、最悪の予決をもつように進化した腫瘍を作り出す病気を予測すること、つまり遺伝に基づく腫瘍の種類の決定に寄与するからである。付け加えると、初期の増幅と欠損についての情報は、二次的な病状の進行を予測するために有用である。CGHによって通常の細胞分裂中期の染色体(ゲノム部位、信号の強度と信号比率の差異、コピー数の相違が見られるゲノム部位の数)に定義されるような遺伝子増幅と欠損は、腫瘍の種類、組織学、Brd/Urdラベル、ホルモンの状態、腫瘍がなくなるような状態、腫瘍の大きさ、生存期間、や医学的、生物統計学的に有用な他の腫瘍の性質など、他の既知のパラメータに関連している。例えば、CGHによってテストされた腫瘍DNAは、増幅と欠損とステージの関係を明らかにするために、異常増幅 *in situ* の血管腫、ステージI-IIIの癌、胚嚢リンパ節などである。

それらの関係は、効果的な治療上の介入を可能にした。例えば、一貫して増幅しつつある領域が、遺伝子の過剰発現や治療上攻撃しえる産物(例えば、成長因子リセプターチロシンキナーゼ、p185^{erbB})を包含している。

他の部位に転移したばかりのプライマリーな癌細胞からの核酸の

CGHハイブリダイゼーションは、薬剤性と関係がある増幅欠損かを確定するために用いられる。例えば、解析する対象の核酸は、およそ半分が化学療法に反応した転移性の病気をもち患者からのもので、あとの半分が反応がなかった患者のものが選ばれる。もし遺伝子の増幅と欠損が急速に薬剤性を発達させる模倣的に不安定であれば、化学耐性の患者からのプライマリーな腫瘍のほうが、化学感受性のある患者のそれよりも増幅または欠損が起こり易いと予想される。例えば、特別な遺伝子の増幅が薬剤性の発現に原因があるならば、それらの遺伝子の周囲の領域は、プライマリーな腫瘍ではなく、化学耐性の患者の腫瘍増殖からの腫瘍細胞では一貫して増幅されていると予想される。遺伝子増幅と欠損、薬剤性の発現性の関係の発見は、患者が補助的な治療からの利益をえられるかどうかの確定を可能にする。

一旦増幅や欠損の新しい領域がCGHによって発見されると、増幅または欠損領域にまたがるプローブを集めて、染色体特異的ペインティングを用いて詳細に研究された [Pinkel et al., *PNAS (USA)*, 88: 9136-9142 (1991); EP Publication No. 430, 492 (June 5, 1991)]. 増幅された領域に対するプローブは、同じ染色体からのセントロメアのシグナルより強いシグナルを示し、一方、増幅されない領域に対するプローブは、セントロメアのシグナルとテストとでおよそ同じ数を示す。例えば、増幅された領域17q22-23と20q12 (例1にあるように増幅領域として新しく発見されたと議論されている)は、CGH (17q22-23領域でより著しく)を用いて腫瘍間でさまざまな大きさを示す。重要な遺伝子を含む領域は、全てのケースにおいて増幅されるような部分を見つけるために、より詳細に多様な腫瘍間の増幅領域をマッピングによ

て限定されることが予想される。それらの研究用のプローブは、例えば、National Laboratory Gene Library Project と National Institute of Health (NIH) ゲノム研究プロジェクトによって特異的コスミドライブラリーに選択される。

c-erbB-2遺伝子は、HER-2やneuに関連しており、185kdの蛋白をコードしている。これまでの研究は、ヒト乳癌腫瘍細胞系にc-erbB-2遺伝子増幅があると報告している。[Kraus et al., *MSD*, 5: 605-610 (1987); van de Vijver et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 2019-2023 (1990).] また、ヒト肺癌のc-erbB-2遺伝子増幅は、病状に関連していることが示され、臨床増悪の予測もつきやすい。[Slamon et al., *Science*, 251: 1545-1550 (1991); Berger et al., *Cancer Res.*, 49: 1233-1234 (1989); Zhou et al., *Cancer Res.*, 49: 6123-6125 (1989); and Venter et al., *Lancet*, 334: 69-71 (1989)] c-erbB-2はまた、肺癌で増幅されることが示された。[Allitalo and Schreiber, *Advances in Cancer Res.*, 17: 225-261 (1989).]

C-mycは、ニワトリのレトロウイルスMC29の形質転換遺伝子の細胞間相同物で原癌遺伝子である。ヒトでは、c-mycは染色体8の長いアームのバンド12.4に乗っており、約5kbの領域に及び、myc蛋白は、核内の存在する転写産物である。c-mycの通常の機能は知られていない。しかし、通常は細胞分裂に関係し、腫瘍細胞と普通に増殖している細胞で発現は変わらない。c-mycに關する転移はその遺伝子の転写を促進、阻害の形質転換につながるものと一般に信じられている。

myc遺伝子ファミリーのN-mycメンバーの配列は、神経芽腫で1000倍に増幅され、示された。N-mycの増幅は、通常

ステージIIIの検出とステージIVで観察される。小細胞の肺腫瘍もまた、2重の減少染色体(DMS)と相対染色体(HSR)の両方でmlyc遺伝子を増幅させる。mlycは、結腸癌でも増幅される。[Allitalo and Schwab, 前述] 再び、そのような増幅は腫瘍の発達の末期にみられ、いわゆる悪性の性質をさまざまな細胞がみせるようになる。増幅は、E-mlyc、N-mlyc、mlyc遺伝子ファミリーの他のメンバー、L-mlycのいずれかに関係している。[Watson et al., 前述 pp.1094-1095]

付け加えると、過剰発現が、多様な悪性性に関するp-糖蛋白遺伝子ファミリーや、P450を含む酵素やグルタチオンS-トランスフェラーゼのような解毒剤に関する酵素に観察される。[Fairchild and Cowan, J. Radiation Oncol. Biol. Phys., 20: 351-367 (1990).]

増幅または欠損した遺伝子の発現は、例えば肺癌のような癌の治療法にとって重要である。それは、いくつかの理由による。

- 1) 予測を改善するため
- 2) 悪性性の発現に関して増幅または欠損を見つけるため
- 3) 治療効果を上げるため

例えば、予測改善に関して言えば、肺癌において癌遺伝子の増幅は、いくつかの研究において、erbB-2やmlycでは頻繁に起き、機能的な成長と乏しい予測に関係している。[Schwab and Auer, *Gene, Chromosome & Cancer*, 1: 181-192 (1990).]

(2)の理由に関することは、遺伝子増幅は明らかにインビトロで悪性性に通じ(例えば、リハイドロフォレートリダクターゼ遺伝子の増幅はメソトレキセートの耐性に通じる。)、治療を経験した患者で起きる(例えば、グルタチオンS-トランスフェラー

ゼとp-糖蛋白の過剰発現の結晶として)が示された。[Fairchild and Cowan, 前述] 耐性に関する遺伝子の増幅は、耐性に関する遺伝子の増幅が起きるように治療修正によって治療に多大な寄与を与えることができる。治療は、特別な治療法として、特定の増幅された遺伝子の過剰発現をしている腫瘍を目標を絞ることにより改善される。

胎児期の診断

病気に関連した染色体異常(すなわち、三染色体性)について胎児期のスクリーニングは、この発明の方法と内容によりそのような異常の急速な検出により助長される。CGH解析は、細胞培養法より速く結果が出るため、胎児期診断には有用である。

反復性配列の除去と反復性配列のハイブリダイゼーション能力の増進

以下の方法は、反復性配列を除去するか、そのような反復性配列のハイブリダイゼーション能力を増進化するために用いられる。その方法は典型的で、広く知られた通常の技術を用いてできるよう図で表される。また、パラメーターや過程に従って修正や拡張も有り得る。

大量複製 ヒトゲノムのような、大量のゲノム内に、散らばった(あるいは共通の)反復配列を持つDNAの大部分は、A1Uのような反復配列の少しのファミリーに含まれる。これらの方法は、一次的に相補的な核酸のハイブリダイゼーション速度が濃度の増加に伴い増加すると言う事実を利用している。もし核酸断片の混合物が変性され、ハイブリダイゼーションを可能にするような条件下で

インキュベートされたなら、高濃度の存在下でその配列は他のものより急速に2重鎖になる。2重鎖核酸は除去され、残りはハイブリダイゼーションに用いられる。その代わり、部分的にハイブリダイゼーションした混合物は、対象の核酸、つまり、ターゲットに結合できない2重鎖配列のように用いられる。以下の方法は、反復配列のハイブリダイゼーション能力を無力化したり、混合物からそれらの配列を除去したりするために有用である典型的な方法である。

自己再結合 ハイブリダイゼーション混合物内の2重鎖核酸は変性され、それから混合物内でかなりのコピー配列が2重鎖になるように充分な時間をかけてハイブリダイゼーション条件下でインキュベートされる。反復配列の残りのラベルされた1重鎖コピーは、参照となる染色体が得く、広くばらまかれた信号を作り出す間、結合する。

複製阻害法 ハイブリダイゼーション能力が阻害されたハイブリダイゼーション混合物中のそれらの配列に相補的なラベルされていない核酸配列を、ハイブリダイゼーション混合物に添加する。対象の核酸と阻害する核酸は変性され、もし必要ならば、適切な条件下でインキュベートされる。阻害される配列は、他のものより急速に2重鎖になる。それゆえ、ハイブリダイゼーション混合物を染色体に適用するとき、参照となる染色体に結合できない、あるときには、阻害反応は急速に起き、インキュベーション時間はひじょうに短くて済む。もしハイブリダイゼーション混合物が変性後即座に染色体に適用されたなら、充分な結果が得られるだろう。さらに、そのプローブとそのターゲットは、ある場合同時に変性される。阻害方法は、一般に Sealy et al., "Removal of Repeat Sequences from Hybridization Probes", *Nucleic Acid Research*, 13: 1805 (1985)

によってサザンハイブリダイゼーションの過程において記載されている。核酸を阻害する例は、ゲノムDNA、ゲノムDNAの大量のコピー断片や以下に概略してあるような特別な配列を含む。

1. **ゲノムDNA** ゲノムDNAはゲノムのコピー数に比例して生物の全ての核酸配列を含む。そうして、ハイブリダイゼーション混合物にゲノムDNAを添加することは、少量コピー配列より大量のコピー反復配列の濃度を増加させる。それゆえ、後者を効果的に阻害する。

2. **ゲノムDNAの大量コピー断片** 大量のコピー配列のみを得たり、阻害のためにそれらを用いるためにゲノムDNAを断片化することは、例えば、以下に記載されているようにヒドロキシアパタイトでなされる。

配列の除去

ヒドロキシアパタイト 1重鎖、または2重鎖核酸はヒドロキシアパタイトに異なる結合能を持つ。その性質から、核酸断片化に用いられる一般的な原理が与えられる。ヒドロキシアパタイトは市販されている。[e.g., BioRad Laboratories, Hercules, CA (USA)]. 反復の特別な領域を含むゲノムDNAの断片は、大量コピーから1回コピーに至るまで、ゲノムDNAを置換することによって得られる。また、ヒドロキシアパタイトを用いる分離法によって、Cotの特別な値を与え、適切な条件下で再混合することを可能にする。1重鎖、または2重鎖核酸もまた、S1ヌクレアーゼを使用して区別される。その技術とCotの概念は、In Britten et al., "Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation", In *Methods in Enzymology*, 29: 353-418 (1974) に説明がある。

固定した核酸を用いた反応。特別な配列の除去もまた、1重鎖“吸収”核酸配列を個体の支持体に結合させることでなされる。1重鎖の元の核酸は固定された核酸にハイブリダイゼーションされる。ハイブリダイゼーション後、結合しない配列は洗い落とされ、CGHに用いられる。例えば、ヒトゲノムDNAは対象の核酸から反復配列を除去するために用いられる。その配列は、Brisson et al., "General Method for Cloning Amplified DNA by Differential Screening with Genomic Probes," *Molecular and Cellular Biology*, **7**: 578-587 (1987)に記載されている。手短かに言うと、最小のヒトゲノムDNAは、シアノニウムセルロースや類似の支持体に結合する。適切に断片化された元のDNAは、固定されたDNAに対して1から100の範囲でC₀tの値を持ち、ハイブリダイゼーションされる。ハイブリダイゼーション条件の好適な環境は、そのDNAの条件に依存して変わる。

ブレイブリダイゼーション。ラベルされていない相補的配列を利用したハイブリダイゼーションによる参照ゲノム内の反復配列結合部位の探索は、その部位に結合する能力を持つ対象の核酸内のラベルされた配列の結合を妨げることである。例えば、ラベルされていないゲノムDNAのハイブリダイゼーションは、参照ゲノム2重鎖内の大量コピー反復配列に寄与する。対象の核酸内でそのような配列のラベルされたコピーは、真意に適合するとき結合できない。

実際に、いくつかのメカニズムが、望んでいる対比と感受性を作るための結合に働く。

対象の核酸の核酸断片のラベルづけ

検出するために利用されている。適切な検出物質には、様々なリガンド、放射能マーカー、蛍光色素、他の蛍光剤、化学発光、酵素基質、補酵素、分子、色素などを含む。好適な典型的なラベルづけの手段はそれらを含む。その中で、プローブ断片はビオチン化されたり、N-アセチルシチニン-N-2-アセチルアミノフルオレンで修正されたり、フルオレシニン イソチオシアネートや他の蛍光色素で修正したり、水素やTNFリガンド、スルホン酸塩化、二酸化したり、T-T二重体を含んだりする。

ラベルづけの好適な方法は、末端トランスフェラーゼラベル法である。もう一つの好適な方法は、ポリメラーゼ延長によって重合された配列プライマーでランダムなプライミングである。これは、もしいくつかのサイクルが用いられるならば、対象の細胞や組織群から得られたほんの少量のDNAでも、対象のDNAの量を増幅する付加的な特色をもつ。

ラベルづけの鍵となる特色は、参照となる染色体に結合する対象の核酸断片が検出されることである。ある場合には、対象の核酸断片の本質的な特徴が、付加された特徴よりもずっとこの目的に活かされる。例えば、RNA/DNA二本鎖を特異的に認識する抗体は、DNAターゲットに結合するRNAから作られたプローブを認識する能力を持つことが見いだされた [Rudkin and Stellar, *Nature*, **255**: 472-473 (1977)]。用いられたRNAは修正されていない。核酸断片は、修正されたマーカーや通常のマーカーの“末端”に接合することによって延長される。通常のマーカー末端が用いられた時、末端部に相補的、蛍光色素や酵素、放射能、修正した塩基、他のラベルを持つ核酸を用いて行った2回目のハイブリダイゼーションが、結合した核酸断片を検出できる。そのシステム

対象の核酸の1重鎖と2重鎖核酸断片にラベルづけするために多くの技術が用いられる。それらは、放射能ラベル e.g. Harper et al., *Chromosomes*, **13**: 431-439 (1984); 蛍光色素や酵素の直接接合 e.g. Smith et al., *Nuc. Acids Res.*, **13**: 2299-2413 (1985); and Connolly et al., *Nuc. Acids Res.*, **13**: 4485-4501 (1985); 免疫学的や他の類似性反応により核酸断片を標々に化学修正 e.g. Chen et al., *Chemically Modified Nucleic Acids as Immunodetectable Probes in Hybridization Experiments*, *PNAS*, **81**: 3466-3470 (1984); Richardson et al., *Biotin and Fluorescent Labeling of RNA Using T4 RNA Ligase*, *Nuc. Acids Res.*, **11**: 6167-6184 (1983); Langer et al., *Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes*, *PNAS*, **78**: 6533-6537 (1981); Brigati et al., *Detection of Viral Genomes in Cultured Cells and Paraffin-Embedded Tissue Sections Using Biotin-Labeled Hybridization Probes*, *Virology*, **125**: 22-50 (1983); Broker et al., *Electron Microscopic Visualization of tRNA Genes with Ferritin-Avidin: Biotin Labels*, *Nuc. Acids Res.*, **5**: 363-366 (1978); Beyer et al., *The Use of the Avidin Biotin Complex as a Tool in Molecular Biology*, *Methods of Biochem. Analysis*, **28**: 1-45 (1980); Kuhlmann, *Immunocytochemistry Techniques in Cytochemistry* (Feinstein, Basal, 1984); Langer-Safer et al., *PNAS (USA)*, **79**: 4381 (1982); Landegren et al., *Exp. Cell Res.*, **153**: 61 (1984); and Hopman et al., *Exp. Cell Res.*, **169**: 357 (1987)の方法が含まれる。ここに示されているように、直接的または間接的に様々な方法が、参照となるゲノムにハイブリダイゼーションするように対象の核酸配列を

は Enzo Biochem [BioBridge Labeling System; Enzo Biochem Inc., New York, N.Y. (USA)] から市販されている。

核酸配列が修正した修正要素を直接的に持たないような、結合核酸断片を検出するもう一つの例は、チミジン2量体に対する抗体を用いた方法である。Nakano et al., *ACTA Histochem. Cytochem.*, **22** (3): 225 (1987)は、そのような方法を図で説明している。それは、チミジン-チミジン2量体化DNA (T-T DNA) が *in situ* ハイブリダイゼーションのマーカーとして用いられる。ハイブリダイゼーションしたT-T DNAはウサギの抗T-T DNA抗体を用いて免疫学的に検出される。

以上の参照に示されたラベルづけの技術の全ては、特別な環境下で用いられる。さらに、既知のラベルづけの技術は、この発明でも対象の核酸をラベルする方法として有用である。いくつかの要素がラベルづけの手段を選択する。それは、染色体DNAに対する核酸断片のハイブリダイゼーションや結合の速度でラベルの効果が違ってきたり、最初のハイブリダイゼーション後にラベルづけの一部に対する核酸断片の接近し易さが変わったり、ラベルづけの一部の融和性や与えるにより生じた信号の強度と性質、ラベルの費用と容易さなどのことである。

異なる方法でラベルされたいくつかの異なる対象となる核酸は、同時に利用できる。その結果、異なる核酸の結合は区別できる。例えば色によって区別できる。

in situ ハイブリダイゼーション

参照となる染色体に対する対象となる核酸の適応は、標準的な *in situ* ハイブリダイゼーションによってなされる。その方法に対す

いくつかの洗滌された系がある。e.g., Gall and Pardue, "Nucleic Acid Hybridization in Cytological Preparations," *Methods in Enzymology*, 31: 470-480 (1981); Henderson, "Cytological Hybridization to Mammalian Chromosomes," *International Review of Cytology*, 75: 1-46 (1982); and Angerer et al., "In situ Hybridization to Cellular RNAs," in *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Setlow and Kollaender, Eds., Vol. 7, pp. 43-85 (Plenum Press, New York, 1985).

一般に、*in situ* ハイブリダイゼーションは以下の主要な段階から成り立っている。(1) 組織及び試験される生物学的構造の固定。(2) ターゲットDNAの感受性を増加させ、非特異的染色を減少させるための生物学的構造への前処理。(3) 生物構造や組織中の核酸と核酸混合物のハイブリダイゼーション。(4) ハイブリダイゼーションで結合しなかった核酸断片を除去するための洗浄処理。(5) ハイブリダイゼーションした核酸断片の検出。これらの工程で用いられた試薬及び使用条件は、特別な状況に依存して変化する。

反復配列のハイブリダイゼーション能力を阻害するためにヒトゲノムDNAを代理として用いたハイブリダイゼーション条件下では、核酸断片は200ベースから1000ベースの大きさが望ましい。或る意味では、2重鎖ニックトランスレーション核酸の検出には400ベースから800ベース、1重鎖またはPCRアダプターリンカー増幅核酸には200ベースから800ベースが望ましい。

実験例1に最適なハイブリダイゼーションプロトコルの詳細が示してある。基本的に Pinkel et al., *PNAS (USA)*, 85: 9138-9142 (1988) and in EP Pub. No. 430, 401 (published June 3, 1991) に記載された染色体特異的染色と同じハイブリダイゼーションプロ

トコルがCGHにも用いられた。

この発明のCGH法を実行する上で以下に表現してある例証は、図解の目的で示してあるので、発明を限定する意味は全くない。

実験例 1

乳腺細胞系から抽出したDNAの局所的な正交な中期染色体へのハイブリダイゼーション

この実験例1では、比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) によるゲノム解析についての本発明の方法を、乳腺細胞系の正常中期染色体へのハイブリダイゼーションによって例示した。高解度反復配列をブロッキングするため、部分的な中期染色体にラベルしていないヒト由来胎盤DNAをプレハイブリダイゼーションした。今回の実験例においてはハイブリダイゼーション混合液中に、細胞系から抽出したラベルしたDNAの他、反復配列を多く含んだラベルしていないCot-1ブロッキングDNA (Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg, MD (USA) から得た。) が加えられている。

以下に概説した実験では、ハイブリダイゼーション混合液中に参照ゲノム (すなわち乳腺細胞系から抽出したDNA)、染色体特異的反復配列プローブ、染色体特異的ベインティングプローブを含む、ビオチンで標識したこれらのプローブは、調製した中期染色体の固定のための付加物として含まれている。実験はまず、染色体特異的プローブを含まない条件で行われた。次に、注目するそれぞれの染色体の長さを他の要素も考慮して測定し、染色体のおおむね同定を行った。次に、染色体特異的プローブを含むハイブリダイゼーション混合液を用いて注目する染色体を厳密に同定した。しかしなが

ら、熟達した細胞遺伝学者がDAPI染色による対抗染色あるいはキナクリンによる染色など他の化学染色によって染色体を同定することが可能ならば、上記のプローブは必ずしも必要ではない。

細胞系およびDNAの分離

確立された6系統の乳腺細胞系、BT-474、SK-BR-3、MCF-7、MDA-MB-361、MDA-MB-468、及びT-47DはAmerican Type Culture Collection (Rockville, Maryland (USA)) から得た。乳腺細胞系の600MPE細胞系はDr. Helene S. Smith [Geraldine Brush Cancer Research Center, San Francisco, CA (USA)] から頂いた。細胞系は無菌的になるまで培養した。細胞は次にトリプシン処理し、1500RPMで5分間遠心することにより回収し、リン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄した。次にDNAは、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 2: 9.18-9.19 [Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (USA) 1989] に従って分離した。

今回用いた、確立されたヒト乳腺細胞系についての詳細は以下の通りである。

BT-474	ヒト原発性癌から始まる。ATCC, catalog #HTB 20から得た。
SK-BR-3	ヒト乳腺癌由来の転移性腫瘍から始まる。ATCC, catalog #HTB 30から得た。
MDA-MB-361	脳へ転移した腫瘍として始まる。ATCC, catalog #HTB 21から得た。
MCF-7	転移性のヒト乳腺癌から始まる。A

TCC, catalog #HTB 22から得た。	
T-47D	転移性のヒト乳腺癌として始まる。ATCC, catalog #HTB 133から得た。
600MPE	転移性のヒト乳腺癌として始まる。Dr. Helene S. Smith [Geraldine Brush Cancer Research Center, San Francisco, CA (USA)] から頂いた。
MDA-MB-468	転移性の乳腺癌として始まる。ATCC, catalog #HTB 132から得た。

正常リンパ球中染色体の調製

末梢血リンパ球はPHAにより刺激し、メトトレキセート処理により同調し、0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のコルセミドを用いて中期でブロックした。細胞は遠心して洗浄し、75 mM KCl中で37°C、15分間インキュベートした。次に細胞はメタノール: 酢酸 (3:1) で固定しスライドガラス上に滴下した。スライドガラスは-20°Cの置置中に保存した。

DNAの標識

細胞系から抽出したDNAはニックトランスレーションによりデイクシゲニン-11-dUTPでラベルした [Higby et al., *J. Mol. Biol.*, 113: 337 (1977); Sambrook et al., *supra*]. ニックトランスレーション後の、変性する前のプローブ断片の最長長は400~800bpである。上に記したように、中期染色体中の注目する染色体を厳密に同定するために、染色体特異的プローブを用いて二重色ハイブリダイゼーションをおこなった。この実験例では以

下のものがビオチン-14-dATPでラベルした染色体特異的参照プローブに含まれる。

- 1) PCT/US90/0434 published August 9, 1990 に記載されたPCRアダプターリンカー法により調製した、第20染色体に対する染色体特異的ペインティングプローブ。
- 2) Los Alamos National Laboratory (Albuquerque, New Mexico (USA))から得た第17染色体コスミドライブラリーから Anne Isiloniが分離した第17染色体セントロメア近傍反復プローブ (cosmid cK17.10)、これと等価な第17染色体に対する染色体特異的反復配列プローブが Oncor (Gaithersburg, MD (USA))から購入できる。
- 3) 第8染色体のセントロメア領域に特異的なアルファサテライト反復プローブ (Dr. Heinz-Ulrich G. Veler: University of California Medical Center, Lab for Cell Analysis, San Francisco, CA (USA))から頂いたこのプローブは、Veler et al., *Hum. Genet.* 17: 489-494 (1991) に記載されているように Dr. Veler が WA1プライマーとWA2プライマーを用いたPCRにより作成した。

当業者には、前述した染色体の同意に使用できる等価のプローブが他にも多く存在することが分かる。例えば、すべてのヒト染色体に対する全体の染色体ペインティングプローブが現在入手可能である [Collins et al., *Genomics* 11: 997-1006 (1991)]。また選択した染色体に特異的に強くハイブリダイゼーションする反復配列プローブも入手可能である [Frank et al., *Hum. Genet.* 71: 251 (1988)]。なおこの文献は、参考文献としてここに引用する。

ノールを加えて15000RPMで30分間遠心することによりDNAを沈澱させた。エタノールを除去し、残留するエタノールが蒸発して見えなくなるまでチューブを自然乾燥させた。50%ホルムアミド、10%硫酸デキストラン、2×SSC (pH 7) から成る10μgのハイブリダイゼーション混合液を加え、注意深く攪拌した。ハイブリダイゼーション混合液中のDNAは70℃で5分間処理して変性し、ついで37℃で80分間処理して再生した。次にこのハイブリダイゼーション混合液を、プレハイブリダイゼーションを行った中期リンパ球のスライドガラス標本に加えた。ハイブリダイゼーションは湿室中でカバーガラスを覆せた状態で、37℃で3-4日行った。

免疫化学プローブの検出

スライドガラスは50%ホルムアミド/2×SSC (pH 7) で3回、2×SSCで2回、0.1×SSCで1回、それぞれ45℃で10分間ずつ洗浄した。洗浄後スライドガラスは室温において3工程 (それぞれ30-45分間) から成る免疫細胞化学的染色を行った。第1工程の免疫細胞化学的染色に先立ち、スライドガラスは1%BSA/4×SSCで5分間プレブロックした。第1の染色工程は1%BSA/4×SSC中に溶解した2μg/mlのチキサスレッドアビジン (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA (USA)) により行った。次にスライドガラスは4×SSC、4×SSC/0.1% Triton X-100、4×SSC、PN (0.1Mリン酸2水素ナトリウム、0.1Mリン酸水素2ナトリウム、pH 8、0.1% Nonidet P-40から成る) でそれぞれ10分間ずつ洗浄し、PNM (5%カーネーションドライミルク、0.

スライドガラスの処理およびプレハイブリダイゼーション

調製した中期リンパ球はまず70%ホルムアミド/2×SSC (1×SSCは0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム)、pH 7、70℃で2分間変性し、70%、85%、100%エタノールで順次脱水処理した。ついでスライドガラスを風乾し、20mMトリス、2mM塩化カルシウム (pH 7.6) を含む緩衝液中で10μg/50mlプロテナーゼK (Boehringer Mannheim GmbH, Indianapolis IN (USA)) による処理を37℃で7.5分間行い、前述したようにエタノールによって脱水処理した。次にスライドガラスは、50%ホルムアミド中に溶解した20μgのラベルしていないヒト胎盤DNA (断片長は200-700bpで、Sigma, St. Louis, MO (USA)) から得た、10%硫酸デキストラン、2×SSC (pH 7) から成る10μlのハイブリダイゼーション混合液中で37℃、60分間のプレハイブリダイゼーションを行った。スライドガラスは、70℃の恒温槽中で5分間変性した後にプレハイブリダイゼーション混合液を加えた。プレハイブリダイゼーション後スライドガラスは2×SSCで1回洗浄し、前述したようにエタノールで脱水処理した。

ハイブリダイゼーション

5μgのラベルしていない反復配列を多く含むCot-1ブロッキングDNA (BRL, Gaithersburg, MD (USA))、ディゴキシゲニンでラベルした60μgの細胞系DNA、ビオチンでラベルした20-60μgの参照プローブ (染色体の同定の確認のため) を混合し、1/10量の3M酢酸ナトリウムを加えた。2倍量の100%エタ

0.2%アジ化ナトリウムをPN緩衝液中に含む) で5分間プレブロックした。第2の抗体付加工程はFITCを結合した2μg/mlの抗ディゴキシゲニンヒツジ抗体 (Boehringer Mannheim GmbH, Indianapolis, IN (USA))、5μg/mlの抗アビジン (Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)) によりPNM中で行い、PNで3回、10分間ずつ洗浄した。PNMによるブロッキング後、第3の免疫化学染色工程は抗ヒツジFITCウサギ抗体 (1:50希釈) [Vector Laboratories]、2μg/mlのチキサスレッドアビジンによりPNM中で行った。PNで8回洗浄後、核染色はアンチフェード溶液中で0.8Mの4,5-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) により対抗染色した。

蛍光顕微鏡観察と結果の解析

FITCとチキサスレッドのシグナルを同時に検出するためダブルバンドパスフィルター [Chroma Technology, Brattleboro, VT (USA)] を装備したニコン顕微鏡 (Nikon Inc., Garden City, NY (USA)) と100×対物レンズを使用した。乳癌細胞系DNAのハイブリダイゼーションは、Y染色体を除くすべての中期染色体のやや薄い緑色のバックグラウンド染色として観察される。乳癌細胞系は女子由来であるため、これらは当然Y染色体を含んでいない。中期染色体中のY染色体に前述の緑色染色が見られないことは、細胞遺伝学的に重要な欠損が検出されることの好例である。Y染色体は参照染色体のDAPI染色によってのみ染色され、乳癌細胞系DNA中にY染色体が含まれていない事が細胞遺伝学的に重要な欠損として検出される。蛍光顕微鏡を用いることにより、増幅された配列が染色体上にあった明るい緑の点またはバンドとして観察さ

れる。

結果の表示を促進するため、また蛍光強度の微小差異を検出する感度を改善するため、デジタル画像解析システム (Q U I P S) を使用した。Q U I P S [quantitative image processing systemの頭文字]は標準ニコンマイクロフォト S A (Nikon Inc., Garden City, NY (USA)) 蛍光顕微鏡に自動化したステージ、焦点調節、フィルターホイール (Ludi Electronics Products Ltd., Hawthorne, NY (USA)) を装備した自動画像解析システムである。フィルターホイールは蛍光励起波長を選択するため顕微鏡の蛍光励起光路に挿入付けられている。ダイクロイックブロック内の特殊フィルター (Chroma Technology, Brattleboro, VT (USA)) は画像表示をシフトすることなく波長の色素を励起することが可能である。顕微鏡は2つのカメラ台座を持ち、1つは焦点調節と共にスライドガラス上の興味ある領域を見つける為の高感度高速ビデオ画像表示用のインテンシフィード C C D カメラ (Quantex Corp., Sunnyvale, CA (USA)) を接続する。もう1つのカメラ台座には高解像度、高感度で真像を得るための冷却 C C D カメラ (Photometrics Ltd., Tucson, AZ (USA)) の model 200 を接続する。

冷却 C C D カメラは VMEバスを避けて SUN 4/330 ワークステーション (SUN Microsystems Inc., Mountain View, CA (USA)) に接続される。多色画像は画像解析ソフトウェアパッケージ S C I L E - I m a g e (Delft Centre for Image Processing, Delft, Netherlands) を用いて制御することにより得られる。多色画像を得て表示するための特殊プログラムの他、カメラ、ステージ、焦点調節、フィルターホイールを制御するためのオプションは S C I L E - I m a g e パッケージに基づいて Division of Molecular Cytomet

ry [University of California, Medical Center; San Francisco, CA (USA)] によって開発された。

比較ハイブリダイゼーションの結果を表示するため、2つあるいは3つの連続的な画像 (D A P I、P I T C、テチナスレッド) を得てスーパーインポーズした。P I T C の画像は S C I L E - I m a g e ソフトウェアのオプションによって閾値化、コントラスト強調した後に表示した。これらのオプションを実行することで染色体全体の蛍光を低減し、増幅された配列をさらに容易に見ることができ、例えば閾値化及びコントラストストレッチングにより、コントラストを増強して細胞系の増幅された配列に由来する染色を定量化することができる。または欠損の検出を促進するため、染色体全体の蛍光を増強して蛍光強度の弱い領域を暗く見せることも可能である。染色体の同定をはかどらせるために参照ブローブは赤色で示した。

参照ブローブを用いた2重色ハイブリダイゼーションで染色体を同定した後、染色体上に沿った断片長の測定によって配列の増幅された単位をローカライズした (断片長 = p-テロメアからシグナルの検出される部位までの距離を染色体全体の長さで割った値)。ついでシグナルの位置は [S C N 1985 I d i o g r a m s (Harnden and Kilger, An International System for Cytogenetic Nomenclature, Karger Ag, Basel, Switzerland (1985))] に基づき断片長の見取りによっておおまかに決定した。

結果

ハイブリダイゼーションの結果は細胞系について知られている他の情報と共に表2表に集計してある。e r b B-2 座および M Y C

座に増幅の見られる細胞系では 17 q 12 (e r b B-2 座) および 8 q 24 (M Y C 座) において増幅がみられ、C G H 法を用いる事によって5から10倍以上の増幅レベルが得られる。さらに、3つの細胞系の 17 q 22-23 で、また3つの細胞系の 20 q 13-14 でいくつかのメガベースにわたる領域が増幅されていた。これらの領域は以前には増幅領域として知られていなかったもので、他の研究からも予想されていなかった。例えば表2表に示した通り B T-474 細胞系は e r b B-2 で13倍の増幅があることが知られていたが、C G H 法によって以下の増幅配列が明らかとなった: 17 q 12 (e r b B-2 座)、17 q 22-q 23、及び 20 q 13-14。後半の2つの部位は以前この細胞系では確認されていなかった。

配列増幅を示すすべての細胞系では、複製の部位における増幅が見られる。複製の部位での同時増幅は以前に報告されており [Van de Vijver et al., *Mol. Cell. Biol.* 7: 2019-2023 (1987); Saint-Huf et al., *Oncogene* 8: 403-406 (1991)]、また時には思わしくない病変に関連する [Borg et al., *Br. J. Cancer* 61: 138-143 (1991)] ことから、同時増幅の証拠は臨床的に重要である。17 q 22-23 での増幅は原発性癌から得たブローブ DNA を用いた場合でも見られた。

(以下省略)

表 2 表
乳癌細胞系の配列増幅を検査した結果

細胞系	起源	成長率; -T d	カルモン レバプタ E/P	知られて いる増幅 (レベル)	C G H 法に より検出さ れた増幅
B7-474	Primary Cancer	48-96 hr	+/-	erbB-2 (13X)	17q12 (erbB-2), 17q22-23, 20qter
SK-BR-3	pl. Effusion	?	?	erbB-2 (1X) MYC(19X)	17q12 (erbB-2), 8q21 8q22-24.1 (MYC), 20qter
MDA-MB-361	Brain met.	<96 hr	-/-	erbB-2 (4X)	17q22-23
MDY-7	pl. Effusion	<48 hr	+/-	erbB-2 (none)	17q22-23 20qter
T-47D	pl. Effusion	?	?	erbB-2 (none)	None
100MPE	pl. Effusion	?	?	erbB-2 (none)	None
MDA-MB-468	pl. Effusion	?	?	erbB-2 (none)	None

実 験 例 2

第5図及び第6図で概要を図示したように、ラベルした2つの異なる対象DNAを用いたハイブリダイゼーションを行った。一方の参照DNAは実験例1で述べた細胞系DNAで、実験例1と同様にラベルしてある。もう一方の参照DNAはデオキシ-14-dATPでラベルしたヒトゲノムDNAである。

染色体特異的参照DNAを用いていない点を除くと実験手順は本質的に実験例1と同じで、ラベルしたヒトDNAとラベルした細胞系DNAを60μgづつ用いてハイブリダイゼーションを行った。もちろん参照となるDNAをハイブリダイゼーション混合液に加えてもよいが、それらは劇的に簡単に別種のラベルをする必要がある。

結果は正常DNAが赤いシグナルで、細胞系DNAが緑のシグナルで示されている。それぞれの染色体について緑と赤の比を決定した。増幅は緑色のシグナルが顕著な領域で示され、欠損は染色体上の他の領域に比べて赤色のシグナルが強い領域で示されている。

例として、乳癌細胞系600MPEのFISHと正常ヒトDNAを用いたCGHの結果は次の通りである。前述したようにハイブリダイゼーションは5μgのCot-1DNA、ディゴキシゲニンでラベルした60μgの600MPE細胞系DNA、及びデオキシ化した60μgの正常ヒトゲノムDNAを用いて行った。600MPEのDNAはFITC（緑）で、ゲノムDNAはテキサスレッドアビジン（赤）でそれぞれ検出した。

600MPE乳癌細胞系は従型が出版されており[Smith et al., *PNCL*, 28: 611-615 (1987)]、正常な第1染色体を1つ、第1染色体の断片を内部にもつマーカーとなる染色体[1(q;13q), 1p(p12),

inv(1)(p16q21)]を8つ含んでいる。このようにこの細胞系は第1染色体のp-テロメア-p22に対してダイソミー、p22-セントロメアに対してトリソミー、q-armに対してテトラソミーとなっている。

この例で示した比較ゲノムハイブリダイゼーション法は、第1染色体上で緑色および赤色の強度によって分離される3つの異なる領域を明らかに特定した。第1染色体のq-armは最も強い緑色を示している（腫瘍DNA）。p22バンドからセントロメアにかけては2番目に緑色の強い領域であり、p-テロメアからp22バンドにわたる領域は最も強い赤色を示している（正常DNA）。これらのハイブリダイゼーションの結果は今述べた細胞系についての伝統的な細胞遺伝学的解析と矛盾しない。

しかしながら実験例3に示したようにCGH法による研究をさらにに行った結果、この実験例のようなCGH解析は出版されている従型と同様、部分的に誤っている事が示された。実験例3のCGH解析はそこに記述したように、最初のCGHの結果及び出版されている従型を訂正するようならなる確証的な実験を必要とする。

実 験 例 3

腫瘍DNAのデビエーション

この実験例における代表的なCGHの実験では高頻度反復配列を含むラベルしていないブロッッキングDNA、特にラベルしていないCot-1ブロッッキングDNA[BRL, Gaithersburg, MD (USA)]が存在下で、デオキシ化した全腫瘍DNA（細胞系DNAおよび原発性腫瘍DNA）とディゴキシゲニンでラベルした正常ヒトゲノムDNAを、正常ヒト中期染色体と同時にハイブリダイゼーションさせた。

以下の段落ではこの実験例における代表的なCGH法の実験手順を詳述した。

DNAラベリング

この実験例で用いたDNAは本質的には実験例1で示した方法によってラベルした。DNAはデオキシ-14-dATPまたはディゴキシゲニン-11-dUTPを用いてニックトランスレーションによりラベルした[rigby et al., *EMBO J*; Sambrook et al., *EMBO J*]。ラベルした後の2本鎖プローブの最長は600-1000bpである。

中期染色体の処理

中期リンパ球標本の調製は実験例1で述べたごとく、固定、脱水、展平、プロテナーゼK処理、脱水を行った。

比較ゲノムハイブリダイゼーション

デオキシ化した60ngのテストするDNA、ディゴキシゲニンでラベルした60ngの正常DNA、ラベルしていない5ngのCot-1DNA（BRL）をエタノール沈降し、50%ホルムアルデヒド、10%硫酸デキストラン、2×SSC（pH7）から成る10μlのハイブリダイゼーション混合液に薄層した。プローブ混合液は70℃で5分間変性処理し、37℃で60時間再生処理した後、37℃で3-4日間正常な男子中期染色体とのハイブリダイゼーションを行った。

蛍光抗体プローブの検出

スライドガラスは実験例1で前述した方法で洗浄した後、室温でそれぞれ30分かかる次の3つの工程により免疫細胞化学的に染色した。（1）5μg/mlのFITC-アビジン[Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA (USA)]と2μg/mlの抗ディゴキシゲニン-ローダミン[Boehringer Mannheim GmbH]を用いた工程。（2）5μg/mlの抗アビジン[Vector Laboratories]を用いる工程。（3）5μg/mlのFITC-アビジンを用いる工程。被検はアンチフェード溶液中で0.8μMの4,5-ジエチル-2-フェニルインドール（DAPI）による対抗染色を行った。FITCとローダミンのシグナルを同時に検出するためダブルバンドパスフィルター[Chroma Technology, Brattleboro, VT (USA)]を装備したZeissの蛍光顕微鏡を使用した。

デジタル画像解析システムと蛍光比のプロファイル

QUIPSは本質的に実験例1で前述した通りで、蛍光シグナルの定量的解析に用いた。染色体に合った蛍光比のプロファイルはWOLZソフトウェアパッケージ[MRC, Edinburgh, Scotland で開発]を用い、以下のように抽出した。DAPIによる染色は同位化することによってそれぞれの染色体の輪郭を決めた。染色体の輪郭はいくつかのオープニング及びクロッキング領域によって平滑化し、修正したMiddich骨格を染色体の中心軸を推くために計算した。DAPIによる染色はインテンシティフィールドが一定値になる（バックグラウンドに達したとき）あるいは増加しはじめる（隣接する染色体のため）までは等方的に広げられる。中心軸に沿った部分及び広がったDAPI染色のインテンシティプロファイルは、中心軸に直交した一定長の線分に沿った緑色と赤色の蛍光ピクセル

画を合計することにより計算した。バックグラウンドレベルの蛍光を低くするため、広がったDAPI画像に対応して基準となる緑色および赤色の強度を求め、蛍光強度の基準値として用いた。

図 4 名

5687	ヒト原発性腎臓癌から始まる。ATCC, catalog #HTB 9から得た。
SK-BR-3	ヒト転移性肺癌から始まる。胸膜浸出由来。ATCC, catalog #HTB 30から得た。
Colo 205	ヒト結腸癌から始まる。ATCC, catalog #CCL 222から得た。
NCI-H808	ヒト食道癌から始まる。ATCC, catalog #CCL 253から得た。
SW480	ヒト結腸癌から始まる。ATCC, catalog #CCL 228から得た。
SW620	ヒト結腸癌のリンパ節から始まる。ATCC, catalog #CCL 227 から得た。
WIDr	ヒト結腸癌から始まる。ATCC, catalog #CCL 213から得た。
SK-N-MC	ヒト神経芽細胞腫（硬膜嚢腫に転移）から始まる。ATCC, catalog #HTB 10から得た。
CaLu3	ヒト肺癌から始まる。胸膜浸出由来。ATCC, catalog #HTB 55から得た。
CaLu6	ヒト過形成性癌、恐らくは肺から始まる。ATCC, catalog #HTB 56から得た。
NCI-H69	ヒト小細胞肺癌から始まる。ATCC, catalog

対象となる腫瘍ゲノムと正常なヒトゲノムから調製した互いに異なるラベルをしたDNAを2重色蛍光でヒト正常中核染色体に1:1ハイブリダイゼーションさせて、検出した腫瘍ゲノム全体にわたって行ったDNA配列コピー数のマッピングを示した。欠損、重複、増幅などDNA配列を喪失または損失した領域は対象となる染色体に沿った2種類の蛍光色素（今回の代表的な実験例で用いた）の強度比の変化として見られる。腫瘍細胞系と原発性腎臓癌を解析することによって16の異なる領域での増幅を同定し、そのうちの多くの座は以前には増幅の報告がなかった。これらの結果は表3表に示す。

腫瘍DNAは緑色蛍光を発するFITC-アピニンで、また正常DNAは赤色蛍光を発するローダミンプロピディンで検出した。与えられた染色体領域における腫瘍および正常DNAの割合の相対量は2つのDNAサンプル中に存在するそれらの配列の相対量に依存しており、緑色蛍光と赤色蛍光の比を測定することにより定量化できる。この実験例では正常DNAは対象となる染色体にハイブリダイゼーションするときの局所的な違いについてのコントロールである。腫瘍DNAの場合、遺伝子増幅または染色体重複では緑/赤の比が大きくなり、欠損または染色体損失ではこの比が小さくなる。ハイブリダイゼーションに用いられるCot-1 DNAはラベルしたDNAがセントロメアおよびヘテロクロマチン領域に結合するのを抑え、したがってこれらの領域は解析から除外されている。

蛍光シグナルは前述したデジタル画像解析システムにより定量的に解析した。このソフトウェアは染色体軸に直交する線分上で緑色および赤色蛍光をサンプリングし、局所的バックグラウンドを減算し、染色

HTB 119から得た。

COLO 320HSR	ヒト結腸癌から始まる。ATCC, catalog #220.1 から得た。
600 PE	ヒト肺癌から始まる。Dr. Helene Smith と Dr. Ling Chen (Geraldine Bruch Cancer Research Center, San Francisco, CA (USA)) から得た。これは実験例1と実験例2で述べた600MPE細胞系と同じである。
BT-20	ヒト肺癌から始まる。ATCC, catalog #HTB 119から得た。

5つの細胞系細胞系についての全染色体数、かつこれにX染色体数を示した。これらはJIGMS repository (Camden, NJ (USA))から得た。

GMO1723	(45, X0)
GMOB399	(46, XX)
GMO4028	(47, XXX)
GMO1415E	(48, XXXX)
GMO5008B	(49, XXXXX)

結果およびディスカッション

CGH法の、ゲノム間で比較した相対的なDNA配列のコピー数を検出しマッピングする能力を示した。悪性腫瘍細胞と正常細胞のDNAを比較することによって、DNAを喪失または損失した領域を同定することから腫瘍についての「コピー数型」を考察することができる。

体に沿って各々の色と緑/赤の比についてインテンシティプロファイル計算する。

染色体全体に影響を及ぼす配列コピー数の変化を定量化するCGH法の能力を、1から5コピーのX染色体と2コピーの常染色体を持つ前述した5つの細胞系細胞系を用いてテストした。45, X0細胞系のDNA（緑）と正常な女子DNA（赤）を用いたハイブリダイゼーションでは、常染色体は一様な緑と赤の染色となり一方X染色体は赤色の強い結果となった。（前述したように正常な男子染色体を参照染色体として用いた。Y染色体の一部が弱く染色されるのは異常染色体領域内の相同配列に対する緑色のためである。）

2, 3, 4, あるいは5コピーのX染色体を持つ細胞系から得たDNAを用いたハイブリダイゼーションの結果、X染色体の緑色蛍光が常染色体のそれと比較するとコピー数に比例して強く弱くなった。X染色体の緑対赤の平均蛍光比（表7図）は、同じ中核染色体標本の常染色体の平均蛍光比に対して規格化した場合、X染色体の数に比例して増加する（相関係数 $r=0.978$ ）。このようにCGH法は4コピーの染色体までなら1コピーの増減を定量的に感測することができる。

CGH法は近3倍体乳癌細胞系、600PEについての完全なコピー数型を決定することができることが実験的に示された。出版されている600PEについての複製[Smith et al., JNCI 71: 611 (1987)]によると600PEは5つのマーカーとなる染色体を持った近3倍体で第1染色体のq-armを4コピー持ち、モノソミー16で、9p, 11q, 17pの欠損を持つ。ビオチン化した600PEのDNA（緑色）とディギキニンでラベルした正常なDNA（赤）を用いたCGH法により、以下の相対的なコピー数の

変化が明らかとなった: 1 q の獲得および 9 p, 18 q, 17 p, 遠位 11 q の損失。これらの異常染色体についての姉-弟の比のプロファイルは第 8 図に示した。第 16 染色体の q-a r m のみがコピー数の相対的な減少を示し、18 p が欠損していないことが示されている。このことは第 16 染色体の p-a r m と q-a r m のコスミドプローブ [16 p 及び 18 q コスミドプローブは Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM (USA) から頂いた] を用いて間隔 800 P E に対する蛍光 $\frac{1}{n} \frac{1}{m} \frac{1}{k}$ ハイブリダイゼーション (FISH) を引き続いて行うことにより確認した。すなわち核あたり、18 p コスミドプローブでは 2 つのシグナル、18 q コスミドプローブでは 1 つのシグナルを得て、姉-弟の比 1, 0 が 2 コピーの配列を表すようなキャリブレーションを可能にした。

このように、細胞ゲノム内のあらゆる部位での絶対コピー数が分かっている場合、すべての部位で絶対コピー数を実際のコピー数に換算することができる。CGH 法の結果は 18 p 及び近位 1 p 領域について最初に出版された類型と異なっている。マーカー染色体のうちの 1 つの一部が簡便な細胞遺伝学的解析により間違えて解析されていたためにこのような相違が生じたということが、部位特異的染色体特異的ペインティング (FISH) によって明らかになった。

2 つの細胞系 (NIGMS 保存施設から得た GMO 5877 及び GMO 1142A) の DNA を用いた CGH によって 13 q-de l (13) (pter>q14, 1: : q21, 2>qter) 及び del (13) (pter>q14, 1: : q22, 1>qter) の RB-1 座位周辺に小さな間欠的欠損が検出された。CGH による解析および第 13 染色体 (全長は 111 メガベース (Mb))

の長さの分数としての欠損サイズの測定に基づき、これらの欠損はそれぞれ 10 Mb および 20 Mb にまたがっていると見られた。このように、CGH 法は癌抑制遺伝子の劣性突然変異を顕化する大きな物理的欠損を同定する目的で完全性腫瘍から得た DNA のスクリーニングに使用できるといえる。

癌遺伝子の増幅が以前に報告されている細胞系について、遺伝子のコピー数の増加を検出する能力について CGH 法を評価した。myc 癌遺伝子周辺の 300 Kb にわたる領域が 50 倍以上に増幅されている [Kinzler et al., *PNAS* (USA), 83:1031 (1986)] ことが知られている結腸癌細胞系 COLO 320 HSR から得た DNA を用いた CGH の結果を第 9 図に示す。予想される通り myc 座位に相当する 8 q 24 で高い姉-弟の比が顕著である。蛍光シグナルは染色体上でアンプリコンの長さよりも広がっているため、ピークの高さは増幅レベルを定量的に反映していない。これは明らかに、変性した染色体上で標的となる DNA が複雑に組織化されているためである。

SK-BR-3 乳癌細胞系で erb B 2 癌遺伝子が 8 倍に増幅されていることが、17 q 12 におけるハイブリダイゼーションシグナルとして CGH により検出できた (第 8 表)。このような高度の増幅が、ラベルした腫瘍 DNA のみを用いた単一色ハイブリダイゼーションで検出可能である。

原発性腫瘍及び細胞系についての細胞遺伝学的あるいは分子的研究により、同一的に染色される領域や二重微小染色体で既知の癌遺伝子を含まないものがしばしば明らかになった [Saito-Ruf et al., *Gene Chrom. Cancer*, 2: 18 (1990); Broderick et al., *Gene Chrom. Cancer*, 2: 13 (1990)]。CGH 法によりこのような

配列を無駄なく検出しマッピングすることが可能である。第 3 表は 11 の腫瘍細胞系を CGH で解析した結果を要約している。第 3 表のデータは多数の中期染色体の視覚検査、およびそれぞれのサンプルについて 4 つから 8 つの中期染色体の詳細なデジタル画像解析に基づいている。

(以下余白)

第 3 表
増殖された癌細胞系と原発性腫瘍の増殖配列の CGH によるマッピング

標本	起源	CGH により 増殖した増幅*	遺伝子増幅の細胞 遺伝学的証拠+
細胞系			
5637	腎癌	3p25, 5p22	DN
SK-BR-3	乳癌	8q24 (myc), 8q21, 17q12 (grb2), 20q13	
Colo 205	結腸直腸癌	8q21, 8q24	
NCI-H508	結腸直腸癌	14q12-17	DN
SW480	結腸直腸癌	8q24 (myc)	DN
SW620	結腸直腸癌	16q11-23	RSR
W1Dr	結腸直腸癌	8q22-24 (myc)	
SK-N-MC	神経芽細胞腫	8q24 (myc)	DN
CaLu3	小細胞癌	8q12-21, 8q21	
		17q12 (grb2)	RSR
CaLu6	小細胞癌	13q32-34	
NCI-H69	小細胞癌	1p14 (H-ras), 1p21, 2q11	
原発性腫瘍			
UR140	腎臓癌	16q21-23	
UR145	腎臓癌	8p22	

* この増幅に最も関係のありそうな癌遺伝子をかっこ内に示した。
+ 細胞遺伝学的情報は IATCC catalog of Cell Lines & Hybrids (1993) に基づいている。

DN=二重微小染色体、RSR=同一的に染色される領域

ゲノム内の16の増幅部位がマッピングされ、このうちの多くは以前には増幅の報告がなかった。このように、多くの遺伝子が癌化または増進中に増幅されている。11の細胞系のうちの5つは複数の部位で増幅が見られる。4つの細胞系では同一染色体内に独立した2つまたは3つの増幅部位がみられ、染色体内の部分的なクラスターがDNA増幅している(第3表および第9図)ことを示している。

CGH法は検出していない原発性腎臓癌の、増幅されたDNAの固定とマッピングにも適用された。検査した7つの癌のうち、2つはDNA増幅を示したがその部位は異なっていた(第3表)。このように、増進行にとって重要な遺伝子を含むと思われる以前には報告のなかった多くの領域がCGH法により固定された。さらに研究を進めることにより、これらの部位のうちのどれかが新しい増幅遺伝子を含んでおり、それが不安定なゲノムの特徴であるランダムで偶然一致したDNA増幅を示している、ということが明らかになる。

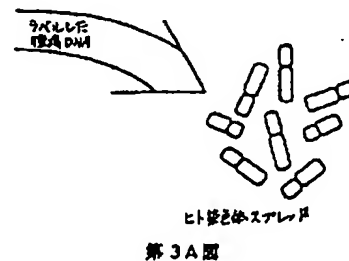
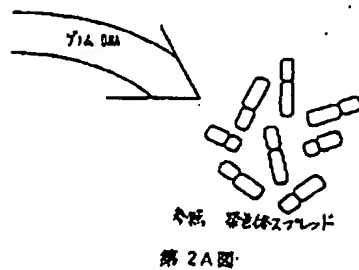
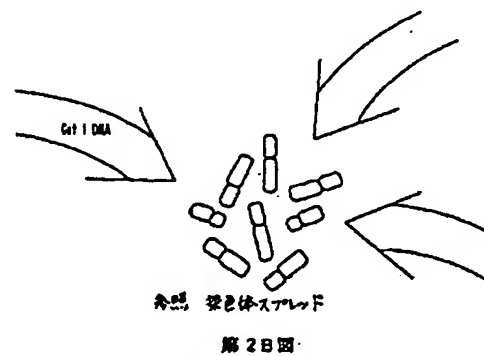
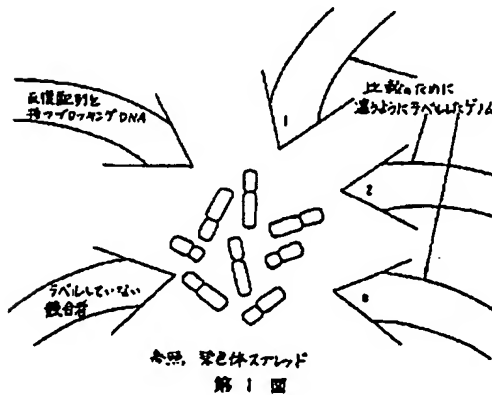
典型的には数百キロベース(Kb)から数Mbにわたる知られていない増幅配列を検出しマッピングすることで、増幅遺伝子を含むゲノム領域の迅速な固定を行うCGH法の有用性が示された。また積極的に、欠損を検出することで癌抑制遺伝子を含む領域の固定が促進される。

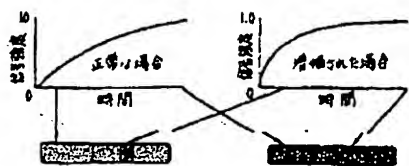
腫瘍では物理的欠損によりどの程度対立遺伝子が損失するかを決定するためさらに研究することが必要である。臨床的標本では正常細胞のDNAが混入する、腫瘍が単一腫瘍から成っていない等の理由からコピー数の小さな変化の検出が細胞系の場合よりも難しい。前述したように、少数の癌細胞(腫瘍内のクローナルな集団)から

PCRを用いて腫瘍DNAを調製することでこの問題を回避しうる。RFLPと同様、CGHは細胞集団中で均一な異常を強調し、存在する異常は平均化する。

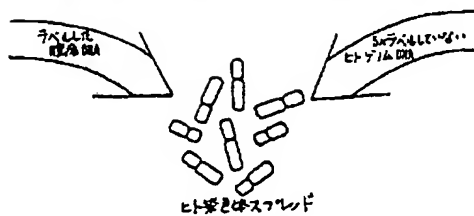
CGHの現在の開発段階では、中期染色体のハイブリダイゼーションシグナルの粒子性が感度の第一の限界となっている。プローブの濃縮およびラベリングの最適化、いくつかの中期染色体の線一歩の蛍光比の平均化によってさらに感度が向上される。

本発明について説明および記述をする目的で、本発明についての実施例を述べた。これはなにも本発明についての全てを述べるあるいは厳格な形式に限定するためではなく、前述した技術についての多くの修正あるいは変更は明らかに可能である。実施例を選択し記述したのは、発明の原理および実験的な応用をよく説明し、他の当業者が本発明をさまざまな実施例でまた各々の利用に適するようになす修正をほどこして、よく利用できるようにするためである。発明の範囲が別に添付した請求の範囲によって定義されることを意図している。ここで引用したすべての文献は引用文献に含めた。

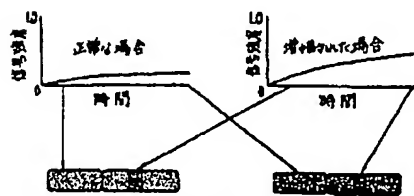




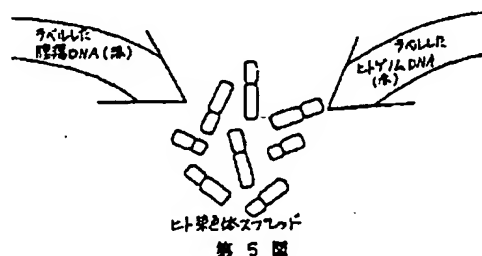
第3B図



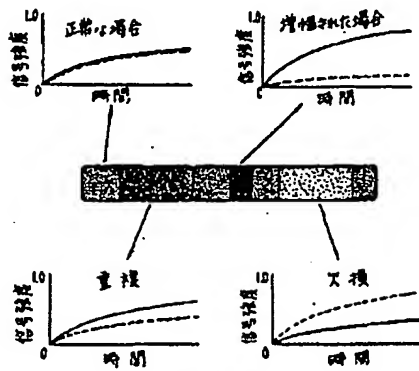
第4A図



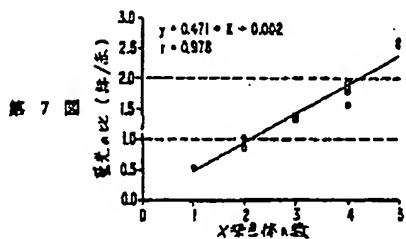
第4B図



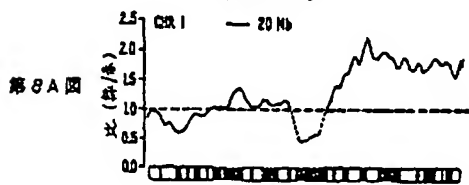
第5図



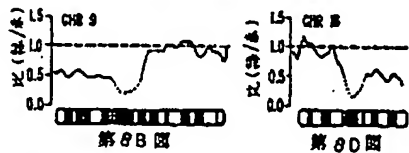
第6図



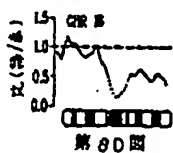
第7図



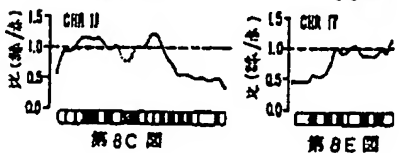
第8A図



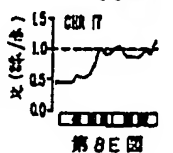
第8B図



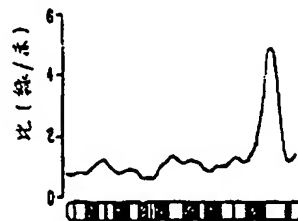
第8D図



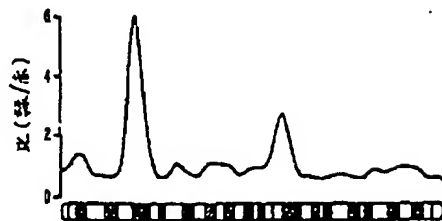
第8C図



第8E図



第9A図



第9B図

1. CLASSIFICATION OF DOCUMENTS a) General classification (by type, nature and content) b) International Document Classification (IDC) or its National Classification and JIC Int.-C1. 3 C1201/40						
2. TITLE AND SUBJECTS <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <th style="width: 50%;">Classification System</th> <th style="width: 50%;">Descriptive System</th> </tr> <tr> <td>Int.-C1. 3</td> <td>C120</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">Documents included into the National Classification is the subject for which Documents are included in the Field Classification</p>			Classification System	Descriptive System	Int.-C1. 3	C120
Classification System	Descriptive System					
Int.-C1. 3	C120					
3. DOCUMENTS COMPILED BY AN INSTITUTION						
Category*	Section of Document, if well indicated, nomenclature, if the section paragraph is	Number in Class list				
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USSR, vol. 63, May 1966, WASHINGTON US pages 2316 - 2320 S. PINDEL ET AL. — cited in the application see the whole document	1				
A	DISCHROMA vol. 63, no. 2, 1961, BERLIN, GERMANY pages 159 - 168 W.V. BUCH ET AL., — see the whole document, especially the abstract	1				
* Special categories of cited documents: <ul style="list-style-type: none"> 1) "if not including the period that of the not cited is not classified in two particular categories" 2) "when Document is published in or after the International Yearbook" 3) "Document is published in some books in primary category or in other category, but not in the particular category of the cited document" 4) "Document is published in some document, not, continues or other series" 5) "Document is published only in the International Bibliography then the not cited may be primary not citation" 						
** Document published after the International Bibliography then the not cited may be primary not citation, but the bibliography and the International Bibliography are not the same thing						
*** Document is published according to the International Bibliography then the not cited may be primary not citation, but the bibliography and the International Bibliography are not the same thing						
**** Document is published according to the International Bibliography then the not cited may be primary not citation, but the bibliography and the International Bibliography are not the same thing						
***** Document is published according to the International Bibliography then the not cited may be primary not citation, but the bibliography and the International Bibliography are not the same thing						
4. CITATION INDEX						
Name of the author Organization of the International Bureau 29 APRIL 1993		Name of Meeting of the International Bureau Bureau 18.05.93				
International Working Order DISCHROMA PATENT OFFICE		Signature of International Officer LUZZATTO E.R.				

Documentary Exemptions For US Citizens		Documentary Exemptions For Foreign Citizens	PCT/US 93/01778
Document	Category of Exemption, and Exemptions, where appropriate, shall exempt persons	Exemptions to Exemptions	Exemptions to Exemptions
A	MO.A.0 306 709 (YALE UNIVERSITY) 31 May 1990 cited in the application see page 2, line 2 - page 4, line 3 see page 22, line 34 - page 23, line 10; cites: figure 3	1.0.9	
A	EP.A.0 430 482 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9 June 1991 cited in the application see page 6, line 54 - page 10, line 8; cites:	1	
P, X	SCIENCE vol. 258, 30 October 1992, LANCASTER, PA 83 pages 818 - 821 A. KALLITZKY ET AL. see the whole document	1.10.11	

This survey lists the patient family members residing in the patient community clinic in the above-mentioned hospitalization month report. The members are identified as the European Patient Office (EPO) file. The European Patient Office is to be kept active for those patients who are newly given for the purpose of information. 29/04/93

Project description (what is being reported)	Publication date	Project family number(s)	Publication date
WD-A-5001783	31-05-90	AU-A- CA-A- CR-A- EP-A- JJ-T-	4442079 2003081 1045372 0441125 4402855
			12-04-94 15-05-98 24-10-98 04-09-91 22-05-92
EP-A-0438402	05-04-91	AU-A- LA-A- JJ-A-	5992790 2821489 3224499
			04-06-91 29-01-91 07-10-91

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, KR

(72)発明者 グレイ ジョー ダブリュー。
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94116 サンフランシスコ イレブンス
トリート 1921

(72)発明者 カリオニエミ アンネ
フィンランド国 タンペレ エスエフ
333-00 リルジャンクジャ 4

(72)発明者 カリオニエミ オリ ベッカ
フィンランド国 タンペレ エスエフ
333-00 リルジャンクジャ 4

(72)発明者 ワルドマン フレデリック
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
94117 サンフランシスコ エッジウッド
アベニュー 206

特表平7-505053

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年8月15日(2000.8.15)

【公表番号】特表平7-505053

【公表日】平成7年6月8日(1995.6.8)

【年通号数】

【出願番号】特願平5-515791

【国際特許分類第7版】

C12Q 1/68

C07H 21/04

C12N 15/09

【FI】

C12Q 1/68 A

C07H 21/04 B

C12N 15/00 A

特許補正書

平成12年 3月 10日

特許庁長官 殿

1. 手 続 の 表 示

平成 5 年 特 許 第 515791 号

2. 補 正 を す る 者

係 所

名 称 デ ヲ フ ェ ン シ ョ ン オ フ ァ ミ リ ー シ ョ ン オ フ
オ リ ジ ナ ル

3. 代 理 人

住 所 〒400-0003

愛知県名古屋市中区錦1丁目6番17号

オゾン株式会社 及び同僚特許事務所

電話 (052) 818-8130

FAX (052) 218-6192

氏 名 (6478) 外 澤 士 長 官 第 一

特 許 第 一
第 一 号
(外 3 名)

4. 補正により追加する請求項の数

5. 補正請求書署名

「特許書」及び「請求の範囲」

6. 補正対象項番号

「発明の詳細な説明」及び「図面の説明」

7. 補正の内容

(1) 明細書の第1頁第5行において

「実質的に異なる」とあるのを

「実質的に同一」と修正する。

(2) 明細書の第1頁第10行において

「実質的に異なる」とあるのを

「実質的に同一」と修正する。

(3) 請求の範囲を明細書と同一に修正する。

(請求の範囲全文を修正するので、読みやすさのため下線を附)

8. 添付書類の目録

(1) 「請求の範囲」を記載した書面

…1 通

請求の範囲

1. 第一の核酸または核酸集団内の特定のDNAまたはRNA配列のコピー数を、第二の核酸または核酸集団内の実質的に同一の配列のコピー数に對して比較する方法であつて、

a) それぞれの核酸または核酸集団からのDNAまたはRNA配列をある装置で増幅増倍するステップと、

b) それぞれの核酸または核酸集団からの前記増幅増倍されたDNAまたはRNA配列を参照となるゲノムに次の条件、

1) 前記増幅増倍されたDNAまたはRNA配列および/または前記参照ゲノムは、必要に応じてその両方配列がプロットングおよび/または検出されている、

1) 前記増幅増倍されたDNAまたはRNA配列の特定のDNAまたはRNA配列および前記参照ゲノム内の特定のDNAまたはRNA配列は検出されている、

2) ハイブリダイゼーションするステップと、

a) 前記参照ゲノムにハイブリダイゼーションしている増幅増倍されたDNAまたはRNA配列からのシグナルの強度と比較して、前記参照ゲノム内の同じ位置にハイブリダイゼーションしている局な増幅増倍されたDNAまたはRNA配列の相対的コピー数を決定するステップとを食んでなる方法、

2. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

前記参照となるゲノムが少なくとも1個の特定の染色体を含むことを特徴とする方法、

3. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

前記第一の核酸または核酸集団および前記第二の核酸または核酸集団の内の少なくとも一つからのDNAまたはRNA配列が直接増幅増倍から検出されていることを特徴とする方法、

4. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

DNAの場合は、前記DNAが染色体DNAまたはcDNAであり、

RNAの場合は、前記RNAがmRNAである

ことを特徴とする方法、

5. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

さらに、前記第一の核酸または核酸集団および前記第二の核酸または核酸集団の内の少なくとも一方からのDNAまたはRNA配列を、前記ハイブリダイゼーションするステップの前に、増幅するステップを含んでなることを特徴とする方法、

6. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

前記増幅増倍されたDNAまたはRNA配列が直接増幅増倍可能であることを特徴とする方法、

7. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

さらに、前記ハイブリダイゼーションするステップの中で、前記増幅増倍されたDNAまたはRNA配列を直接増幅増倍するステップを含んでなることを特徴とする方法、

8. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

前記ハイブリダイゼーションがインシットで行われ、

前記参照ゲノムが参照となる中核の染色体を含む、そして

前記増幅増倍された核酸配列からのシグナル強度が前記参照ゲノム内の位置の関数として決定されることを特徴とする方法、

9. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

前記増幅増倍されたDNAまたはRNA配列が前記参照ゲノムの一部分にハイブリダイゼーションしている

ことを特徴とする方法、

10. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

前記増幅増倍されたDNAまたはRNA配列からのシグナルの強度を比較するステップが、前記シグナルの強度の比率を、前記参照ゲノム内の位置の関数として決定することを含む、

この方法が、さらに、前記参照ゲノムにわたる異なる増幅増倍の強度比率を定量的に比較するステップを含んでなり、前記定量的に比較する増幅増倍の核酸または核酸集団内の当該位置に相当している前記参照のコピー数と前記第二の核酸または核酸集団内の実質的に同一の配列のコピー数とを比較してなる

ことを特徴とする方法、

11. 請求の範囲第1項に記載の方法であつて、

前記第一の核酸または核酸集団および前記第二の核酸または核酸集団の内の一方が直接増幅増倍された核酸集団であり、他方が直接増幅増倍とは異なる集団であることを特徴とする方法、

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.